

Proliferationsfaktoren als Marker für die Metastasierung bei nicht-seminomatösen Keimzelltumoren

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Kneißl, Markus
aus Weiden i.d.Opf.

Gießen 2007

Aus dem Bundeswehrkrankenhaus Ulm
Abteilung Urologie

Abteilungsleiter:
Herr Oberstarzt Prof. Dr. med. C. Sparwasser

Gutachter: PD Dr. Schmelz

Gutachter: Prof. Dr. Weidner

Tag der Disputation: 11.11.2008

1	Einleitung	5
1.1	Epidemiologie.....	5
1.2	Klassifikation	7
1.3	Risikofaktoren.....	9
1.4	Diagnostik.....	9
1.4.1	Basis-Diagnostik.....	9
1.4.2	Staging	10
1.4.3	Tumor-Proliferationsmarker	10
1.5	Problemstellung und Zielsetzung	12
2	Material und Methoden	14
2.1	Patienten.....	14
2.2	Färbung der Präparate	14
2.3	Positivkontrolle / Negativkontrolle	16
2.4	Auszählungsverfahren	16
2.5	Labormethoden.....	17
2.5.1	Ansatz der Primär- und Sekundär-AK	17
2.5.2	Immunhistochemie mit PCNA / Ki67	18
2.6	Statistische Auswertung.....	20
3	Ergebnisse	21
3.1	Auswertung der einzelnen Zellschnittpräparate	21
3.2	Zusammenhang mit der Metastasierung.....	23
3.2.1	Prozentuale Anteile PCNA- und Ki67-positiver Zellen	23
3.3	Abhängigkeit vom Alter	25
3.3.1	Prozentuale Anteile PCNA- und Ki67-positiver Zellen	25
3.4	Abhängigkeit von der Tumorart.....	32
3.4.1	Prozentuale Anteile PCNA- und Ki67-positiver Zellen	32

4	Diskussion.....	36
4.1	Zusammenhang zwischen Proliferation und Metastasierung	40
4.1.1	Ki67	41
4.1.2	PCNA	44
4.1.3	Zusammenhang zwischen Proliferationsmarkern und Alter	45
4.1.4	Zusammenhang zwischen Proliferationsmarkern und Tumorart.....	51
5	Zusammenfassung	54
6	Summary	56
7	Literaturverzeichnis	58
8	Anhang.....	70
9	Erklärung	72
10	Danksagung.....	73

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie

Hodentumoren gehören mit einer Prävalenz von nur einem Prozent zu den seltenen malignen Erkrankungen beim Mann. Bei Männern zwischen dem 25. und 35. Lebensjahr ist der Hodentumor allerdings dennoch die häufigste Krebsart (Bokemeyer und Hossfeld, 2004).

Die Inzidenz des Hodentumors war im Jahr 2002 mit 10,1 pro 100.000 männliche Einwohner in Deutschland, im Vergleich mit anderen europäischen Ländern, relativ hoch. Etwas höhere Raten fanden sich nur in Norwegen (11,0) und Dänemark (10,8). Insgesamt war die Inzidenz in Westeuropa mit 8,5 pro 100.000 deutlich höher als in den anderen Regionen Europas; die niedrigsten Raten fanden sich in Ost- und Südeuropa mit 3,0 bzw. 3,4 pro 100.000 (Tab. 1).

Weltweit fanden sich im Jahr 2002 ähnlich hohe Inzidenzraten wie in West- und Nordeuropa lediglich in Nordamerika mit 5,8 pro 100.000. Im Südamerika betrug die Inzidenz nur 2,6 pro 100.000, in Afrika nur 0,3 bis 0,9 und in Ostasien sogar nur 0,5 pro 100.000 (IARC, 2002).

In Deutschland zeigt die Inzidenz der Hodentumore deutlich ansteigende Tendenz. Während im Saarland im Jahr 1970 noch 3,31 Erkrankungen pro 100.000 registriert wurden, waren dies im Jahr 1995 bereits 8,41 Erkrankungen (Abb. 1).

Auch in anderen Ländern und Regionen ist eine ansteigende Inzidenz von Hodentumoren zu beobachten. Neben Deutschland ist die stärkste Zunahme in Skandinavien und Neuseeland zu verzeichnen; in Asien hingegen ist der Anstieg der Inzidenz am geringsten (Weißbach et al. 1995).

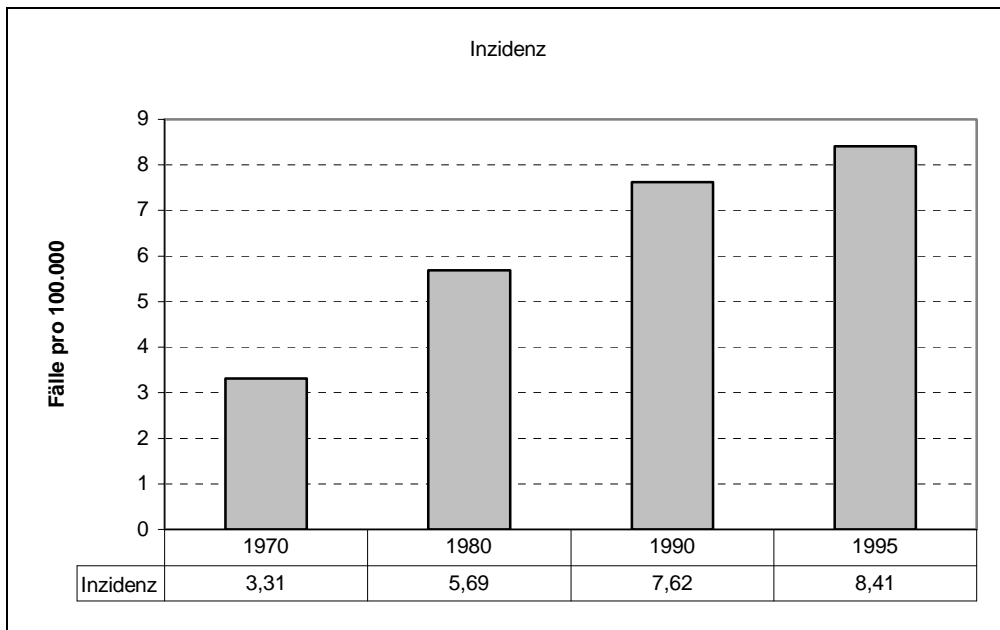
Der Altersgipfel liegt bei den Hodentumoren in Abhängigkeit vom histologischen Befund bei 26 Jahren für das Nicht-Seminom (NS) und bei 36 Jahren für das Seminom (SE) (Albers, 2002).

Epidemiologische Untersuchungen ergaben, dass in den letzten Jahren die Diagnosen in immer früheren Tumorstadien gestellt werden. Derzeit werden etwa 90 Prozent aller Hodentumore bereits im Frühstadium diagnostiziert (Albers, 2002).

Tab. 1: Inzidenz und Mortalität von Hodentumoren in ausgewählten europäischen Ländern im Jahr 2002 (IARC, 2002). n=Anzahl

Land	Inzidenz		Mortalität	
	Absolut (n)	N pro 100.000	Absolut (n)	n pro 100.000
Deutschland	4047	10,1	210	0,5
Frankreich	2065	7,1	101	0,3
Belgien	278	5,5	14	0,3
Dänemark	285	10,8	12	0,5
Norwegen	245	11,0	8	0,4
Schweden	256	5,9	9	0,2
U.K	1998	6,8	82	0,3
Griechenland	187	3,6	19	0,4
Italien	872	3,1	77	0,3
Spanien	418	2,1	37	0,2
West-Europa	7670	8,5	386	0,4
Nord-Europa	3063	6,6	152	0,3
Ost-Europa	4295	3,0	1084	0,8
Süd-Europa	2382	3,4	230	0,3

Quelle: International Agency for Research of Cancer (IARC); GLOBOCAN 2002 Datenbank

Abb. 1: Inzidenz der Hodentumore in Deutschland (Saarland) zwischen 1970 und 1995 (IARC).

Quelle: International Agency for Research of Cancer (IARC); CI5 I-VIII updated

1.2 Klassifikation

Um eine einheitliche Basis für Beschreibung von Tumorerkrankungen zu haben, ist es erforderlich, dass die verschiedenen Tumorarten nach einheitlichen Systemen klassifiziert werden. Nur auf diese Weise ist es möglich, die Daten verschiedener Studien miteinander zu vergleichen. Darüber hinaus kann anhand der Klassifikation eine Stadieneinteilung vorgenommen werden, die es ermöglicht, Aussagen zur Behandlung und zur Prognose zu machen (Sobin, 2001).

Eines der wichtigsten Instrumente zur Einteilung von Tumorerkrankungen ist das bekannte TNM-System, welches seit Jahrzehnten international gebräuchlich ist. Seit Einführung des TNM-Systems vor über 50 Jahren wurde dieses System immer wieder an den neuesten medizinisch-wissenschaftlichen Erkenntnisstand angepasst, vor allem mit dem Ziel, die prognostische Aussagekraft zu erhöhen und um mit den Anforderungen

der klinischen Praxis schritthalten zu können. Der letzte Konsensusbericht zur Diagnose und Therapie von Hodentumoren wurde im Jahr 2004 publiziert (Schmoll et al. 2004).

Die Klassifikation für den Hodentumor wurde um das Merkmal "S" ergänzt, welches die Serummarker HCG, AFP und LDH repräsentiert, da diese Tumormarker eine besondere Rolle bei der Diagnostik und der Prognose von Hodentumoren spielen (Anlage 1).

Die TNM-Klassifikation nach UICC bildet die Grundlage der klinischen Stadieneinteilung. Anhand solcher klinischer Einteilungen können therapeutische Entscheidungen getroffen werden. Ferner wird es ermöglicht, eine Aussage hinsichtlich der Prognose abzugeben. Schließlich kann mittels solcher Einteilungen auch eine Vergleichbarkeit verschiedener Datenerhebungen und Untersuchungen gewährleistet werden. So können zum Beispiel unterschiedliche therapeutische Ansätze in verschiedenen Studiengruppen miteinander verglichen werden. Für die Verbesserung der Therapie ist dies von entscheidender Relevanz (Gospodarowicz et al. 2003).

Ein weiteres klinisches Einteilungs-Schema für Hodentumore ist die Klassifikation nach Lugano. Diese Klassifikation ist in Europa sehr gebräuchlich und bewertet den Ausbreitungsgrad sowie die Größe der Metastasen (Tab. 2).

Tab. 2: Klassifikation der Hodentumore nach Lugano.

Stadium	
I	Tumor auf Hoden beschränkt. Keine Metastasen nachweisbar.
II A	Retroperitoneale Metastasen < 2cm
II B	Mindestens eine retroperitoneale Metastase > 5cm
II C	Retroperitoneale Metastasen > 5cm
III A	Supraklavikuläre oder mediastinale Lymphknotenmetastasen
III B	Lungenmetastasen
III C	Hämatogene Metastasen außerhalb der Lunge

Quelle: Albers, 2002

1.3 Risikofaktoren

Zu den bekannten und wissenschaftlich gesicherten Risikofaktoren gehören der Maldezensus, der kontralaterale Hoden- bzw. Keimzelltumor und das Vorkommen von Hodentumoren in der Familie. Das größte Risiko besteht beim kontralateralen Hodentumor. Die Wahrscheinlichkeit der Tumorentwicklung ist hier um den Faktor 25 erhöht. Der Maldezensus ist mit einem etwa fünffach erhöhten Risiko behaftet; bei familiärer Belastung ist das Risiko um den Faktor 3 bis 10 erhöht (Dieckmann und Pichlmeier, 2004). Das Risiko bezieht sich im letzteren Fall vornehmlich auf Verwandte ersten Grades (Dieckmann und Pichlmeier, 1997).

1.4 Diagnostik

1.4.1 Basis-Diagnostik

Die primäre Diagnostik des Hodentumors umfasst Palpation, Sonografie und Bestimmung der Tumormarker AFP, β -HCG und LDH (Nichols, 1998). Die Sonografie des Hodens weist eine Sensitivität von 100 Prozent auf. Die Spezifität beträgt allerdings nur etwa 35 Prozent. Dies bedeutet, dass durch die Sonografie ein maligner Hodentumor praktisch ausgeschlossen werden kann. Bei verdächtigem Sonografie-Befund handelt es sich jedoch nur etwa in einem Drittel der Fälle um maligne Tumore (Robertson, 1995).

In allen Verdachtsfällen sollte eine Freilegung des Hodens und im positiven Fall eine Hodenentfernung (Ablatio testis) durchgeführt werden. Bei makroskopisch unklarer Dignität muss eine intraoperative Schnellschnittdiagnostik erfolgen, denn in etwa zehn Prozent der Fälle handelt es sich um gutartige Tumore (Robertson, 1995).

Bei etwa fünf Prozent der Patienten findet sich im kontralateralen Hoden eine testikuläre intraepitheliale Neoplasie (TIN). Diese kann in 99 Prozent der Fälle durch eine offene Biopsie nachgewiesen werden. Eine solche Untersuchung wird jedoch nur bei Vorliegen von Risikokonstellationen empfohlen, wie sie etwa bei Hodenatrophie (Volumen des

Hodens < 12 ml) und einem Alter unterhalb 31 Jahren gegeben sind (Harland et al. 1998; Souchon et al. 2000).

Im Rahmen der Primärdiagnostik sollten bei bestehendem Kinderwunsch die Hormone Testosteron, LH und FSH bestimmt und ein Spermiogramm angefertigt werden. Der Patient sollte über die Möglichkeit der Kryokonservierung der Spermien aufgeklärt werden (Kliesch et al. 1996; Petersen et al. 1999).

1.4.2 Staging

Das Standardverfahren zur Ermittlung der Ausbreitung und der klinischen Stadieneinteilung ist die Computertomografie (CT) von Thorax, Abdomen und Becken. Die Untersuchung wird mit oralem und intravenösem Kontrastmittel durchgeführt. Die Differenzierung der Stadien I und IIA sind allerdings nur begrenzt möglich, da sowohl falsch positive als auch falsch negative Befunde mit einer Häufigkeit von jeweils ca. 30 Prozent zu erwarten sind. Andere diagnostische Verfahren, wie Sonografie, Röntgen, Kernspintomografie und PET sind unzureichend oder bringen keinen zusätzlichen Nutzen. Schädel-CT und Knochenszintigramm werden nur bei fortgeschrittenen Stadien empfohlen (Souchon et al. 2000).

1.4.3 Tumor-Proliferationsmarker

Ein anderer Ansatz des Stagings bei nicht-seminomatösen Hodentumoren im klinischen Stadium I könnte sich durch den Einsatz von Tumor-Proliferationsfaktoren anbieten. Es ist bekannt, dass bei Tumoren der Grad der Zellproliferation als prognostischer Faktor verwendet werden kann (Donhuijsen, 1998). So ist es heute problemlos möglich, die Proliferation der Tumorzellen durch die immunhistochemischen Marker Ki67 (Ki67-Antigen) und PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) am formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Tumorgewebe darzustellen und zu quantifizieren. Hierbei wird

das Antigen Ki67 durch den gängigen Antikörper MIB-1 markiert. Je nach Tumortyp sind hierbei unterschiedliche prognostisch relevante Schwellenwerte zu beachten (Matsumoto et al. 1987; Wilkinson et al. 1995). Beim Mammakarzinom gelten zum Beispiel weniger als 13 Prozent positiver Ki67-Zellen als prognostisch günstig und mehr als 20 Prozent als prognostisch ungünstig (Lellé et al. 1987). Auch für Hodentumoren im Frühstadium liegen bereits einzelne Untersuchungen vor, wobei bisher noch keine eindeutigen Schwellenwerte definiert wurden und die klinische Relevanz dieser Marker zum Teil auch noch strittig ist (Sarli et al. 1994; Albers et al. 1997; Foster und Nichols, 1999).

1.5 Problemstellung und Zielsetzung

Im klinischen Stadium I der nicht-seminomatösen Hodentumoren, also beim Fehlen von klinischen Zeichen für eine Metastasierung, finden sich dennoch bei 17 bis 50 Prozent der Patienten okkulte retroperitoneale Metastasen (Souchon et al. 2002). Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass bei mindestens 50 Prozent der Patienten keine Metastasen vorhanden sind und diese Patienten nach der alleinigen Orchiektomie bereits geheilt wären. Würde man bei allen Patienten eine Behandlung, wie zum Beispiel die adjuvante Chemotherapie, durchführen, wären also mindestens 50 Prozent übertherapiert. Aus diesem Grunde ging man dazu über, als alternatives Verfahren die sog. Surveillance einzuführen, was bedeutet, dass auf die Therapie verzichtet wird und die Patienten lediglich überwacht werden. Dabei werden zwei Gruppen differenziert, nämlich eine sog. Low-Risk-Gruppe und eine High-Risk-Gruppe. Die Einteilung erfolgt in Abhängigkeit des Vorliegens einer vaskulären Invasion des Tumors. Liegt eine solche Invasion vor, so beträgt das Risiko okkulter Metastasen etwa 50 Prozent (High-Risk-Gruppe). Bei diesen Patienten wird eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt. Beim Fehlen der vaskulären Invasion beträgt die Wahrscheinlichkeit einer okkulten Metastasierung hingegen nur etwa 15 Prozent (Low-Risk-Gruppe). Diese Patienten werden einer Surveillance unterzogen (Souchon et al. 2002; Schmoll et al. 2004).

Man kann davon ausgehen, dass die Proliferation für die Metastasierung eines Tumors eine Rolle spielt. Eine Methode zur Ermittlung der Proliferation von Hodentumoren ist die Bestimmung von Proliferationsmarkern. Das zugrunde liegende Prinzip dabei ist, dass proliferierende Zellen auf deren Oberfläche Antigene exprimieren, die von ruhenden Zellen nicht exprimiert werden. Die klassischen Oberflächenantigene sind PCNA und Ki67 (Albers et al. 1995b; Albers et al. 1995c).

In unserer Untersuchung sollte der Zusammenhang zwischen den Proliferationsmarkern PCNA und Ki67 und dem Vorliegen von Metastasen aufgezeigt werden. Primäres Ziel hierbei war es, anhand dieser Proliferationsmarker das Risiko okkulter Metastasen noch besser abschätzen zu können, um künftig die therapeutische Sicherheit für jene Patien-

ten zu erhöhen, bei denen eine Surveillance durchgeführt wird bzw. um über weitere Prädiktoren für die Einteilung in Low- und High-Risk-Gruppen zu verfügen.

2 Material und Methoden

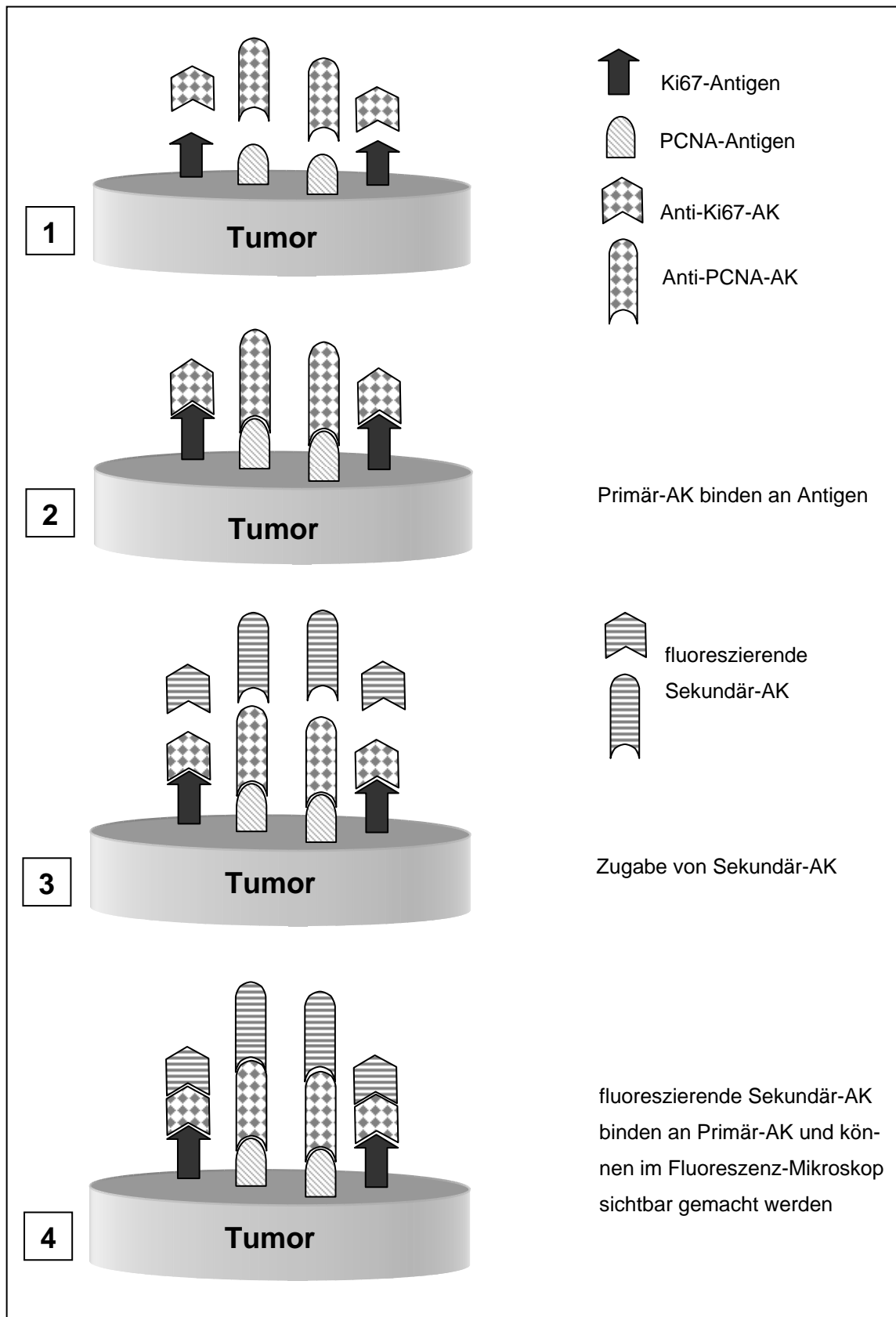
2.1 Patienten

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden die histologischen Präparate von insgesamt 37 nicht-seminomatösen Hodentumoren (NSGCT) untersucht. Unter diesen 37 NSGCT fanden sich sechs adulte Teratome und vier Mischtumore (adulte Teratome mit Anteilen anderer Tumorzellarten). Bei den verbleibenden 26 NSGCT, die keine Teratome waren, handelte es sich ausschließlich um Mischtumore; in keinem dieser Fälle fand sich ein reines Embryonalkarzinom. Nicht untersucht wurde der Anteil unterschiedlicher Histologien im Primärtumor.

In allen Fällen war die Metastasierung durch eine retroperitonealen Lymphadenektomie pathologisch bestimmt worden. Dabei handelte es sich um 18 Präparate von Patienten mit Metastasen und um 19 Präparate von Patienten ohne Metastasen (pN0 und M0). Bei allen metastasierten Tumoren lag entweder das Lugano-Stadium IIa oder IIb vor. Tumoren mit Lugano-Stadium IIc oder höher fanden sich nicht im Untersuchungsgut.

2.2 Färbung der Präparate

Mittels immun-histochemischer Färbung wurden die Proliferationsmarker bzw. die vom Tumor an der Oberfläche exprimierten Antigene Ki67 und PCNA markiert. Hierzu wurden in einem ersten Schritt zunächst Ki67- und PCNA-Antikörper zum Präparat hinzugegeben. Daraufhin folgte in einem zweiten Schritt die Bindung dieser AK an die Ki67- und PCNA-Antigene, soweit vorhanden. In einem dritten Schritt wurden anschließend mit Fluoreszenzstoffen markierte Sekundär-AK gegen die Primär-AK hinzugefügt. Diese wiederum banden schließlich in einem vierten Schritt an die Primär-AK. Mit einem Fluoreszenzmikroskop konnten die markierten Ki-67- und PCNA-Antigene auf diese Weise sichtbar gemacht werden (Abb. 2).

Abb. 2: Prinzip der immun-histochemischen Färbung zum Nachweis von Tumor-Antigenen.

2.3 Positivkontrolle / Negativkontrolle

Um die Wirksamkeit der Färbemethode zu überprüfen wurde an jedem Färbetag nach Ansatz des Substrates eine Positiv-Kontrolle durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden Zellen gefärbt, von welchen mit Sicherheit bekannt war, dass sie Ki-76 bzw. PCNA exprimieren. Hierbei kamen Zellen von Tonsillen zur Anwendung.

Die Negativkontrolle wurde durch Weglassen der Primär-AK durchgeführt, ansonsten war der Versuchsaufbau identisch.

2.4 Auszählungsverfahren

Die Schnitte wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskops ausgewertet. Hierbei wurde sowohl die Anzahl markierter Ki-67- bzw. PCNA-positiver Zellen, als auch die Gesamtzellzahl, durch Auszählung von jeweils 20 Gesichtsfeldern bestimmt. Auf diese Weise konnte der Proliferationsindex (Anteil der positiven Zellen an der Gesamtzellzahl) für Ki67 und PCNA bestimmt werden.

2.5 Labormethoden

2.5.1 Ansatz der Primär- und Sekundär-AK

Ansatz des Primär-AK:

Positiv-Kontrolle:

Substrat	Menge (in µl)
Primär-AK	15,00
Normalserum	2,25
PBS	<u>132,75</u>
	150 µl

Negativ-Kontrolle:

Substrat	Menge (in µl)
Normalserum	2,25
PBS	<u>147,75</u>

Ansatz des Sekundär-AK:

Substrat	Menge (in µl)
Normalserum	1,50
Serum-AK	1,50
PBS	<u>297,00</u>
	300 µl

2.5.2 Immunhistochemie mit PCNA / Ki67

Arbeitsanweisung:

1. Entparaffinieren
 - 2x10 min Xylol
 - 1x5 min Aceton 70%
 - 1x5 min Aceton 50%
2. Mikrowellenbehandlung
 - 620 W 5 min (Citrat-Puffer)
 - frischer Citrat-Puffer
 - 620 W 5 min (Citrat-Puffer)
 - frischer Citrat-Puffer
 - 620 W 5 min (Citrat-Puffer)
3. Abkühlen 20 bis 30 min im Citrat-Puffer
4. Waschen in A. dest. 3x2 min und Flüssigkeit entfernen
5. Feuchte Kammer vorbereiten (z.B. in Objektträgerkasten zwei in A. dest. getauchte Papiertücher)
6. Blockierung des Hintergrundes mit Normalserum (Donkey oder Goat) 10% (1:10) für 30 min Donkey auf Präp., die mit Anti-Human-AK vom Donkey gefärbt werden
7. Schnitte 2x5 min mit PBS waschen
8. Primärantikörper 1:10 mit Normalserum (Donkey oder Goat) verdünnen mit Normalserum 1,5%
Das gesamte Volumen für einen Schnitt beträgt 100 bis 200 µl
9. Schnitte mit verdünntem Primär-AK überschichten. Zu jeder Markierung eine Kontrolle mitführen. Dazu einen Schnitt nur mit verdünntem NS überschichten und nicht mit dem primären AK. Anschließend 60 min bei Raumtemperatur inkubieren.
10. Antikörper abkippen, vorsichtig mit PBS (Spritzflasche) abspülen und 2x5 min in einer Küvette mit PBS auf einem Schüttler waschen. (Waschen in getrennten Gefäßen, Positiv- und Negativkontrolle!)

11. Während des Waschens Sekundär-AK herstellen. Dazu den AK (z.B. Cy₃ Goat anti mouse) mit 1:200 Normalserum (Donkey anti mouse in Donkey Serum) verdünnen. Auch hier je nach Größe des Schnittes 100 bis 200 µl herstellen.
Wichtig: da die sekundären AK mit einem Fluorochrom konjugiert sind, diese so wenig wie möglich dem Licht aussetzen!
Verdünnung Sekundär-AK 1:200
12. nach dem Waschen die OT wie oben beschrieben abwischen und in die feuchte Kammer legen.
13. Die Schnitte mit dem sekundären AK überschichten. Anschließend die feuchte Kammer abdecken und / oder an einem lichtgeschützten Ort für 30 min inkubieren. Während der letzten Minuten Kernfärbung vorbereiten. Dazu eine DAPI-Stammlösung 1:100 verdünnen, Menge w.o. / Schnitt
14. Während der letzten 5 min der Inkubation mit dem Sekundär-AK DAPI dazugeben.
15. AK und DAPI abkippen, vorsichtig mit A. dest. (Spritzflasche) abspülen und 2x10 min in Küvette auf dem Schüttler waschen. Dazu die Küvetten an einen lichtgeschützten Ort stellen (z.B. Karton auf Schüttler). Anschließend A. dest. abkippen und OT abwischen.
16. Schnitte mit Vectashield eindecken und in einen dunklen Objektträgerkasten geben. Falls die Schnitte nicht sofort ausgewertet werden, diese nicht eindecken und in OT Kasten bei 4°C lagern.

2.6 Statistische Auswertung

Alle Berechnungen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS Version 11 durchgeführt (SPSS GmbH, München).

Die Ergebnisse wurden in der Regel als Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) angegeben. Wo absolute Zahlen dargestellt wurden, findet sich in der Regel auch eine Angabe in Prozent.

Die Korrelationen der verschiedenen Parameter untereinander wurden nach Pearson berechnet. Das Signifikanzniveau (2-seitig) wurde mit 0,05 festgelegt.

Für den Vergleich von Parametern zwischen zwei Gruppen (z.B.: Ki67 vs. PCNA) wurde der T-Test für unabhängige Stichproben angewandt. Das Konfidenzintervall wurde mit 95 Prozent, das Signifikanzniveau mit 0,05 (2-seitig) festgelegt. Die Gleichheit der Varianzen wurde mit dem Levene-Test überprüft. Dabei wurde eine Homogenität der Varianzen dann angenommen, wenn die Signifikanz dieses Tests größer als 0,25 war. Bei Ergebnissen kleiner 0,05 wurde von inhomogenen Varianzen ausgegangen und die entsprechende Signifikanz des T-Tests gewählt. Für den Bereich dazwischen (0,05 bis 0,25) wurde jeweils die zugehörige schwächere Signifikanz des T-Tests gewählt, um die Sicherheit der Aussage zu erhöhen.

Für den Vergleich der drei Merkmale innerhalb einer Gruppe (metastasiert, nicht-metastasiert und nicht beurteilbar), wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Die Homogenität der Varianzen wurde hierbei wiederum mit dem Levene-Test überprüft. Sofern sich ein statistisch signifikanter Gruppenunterschied ergeben hatte, wurde ein Post-Hoc-Mehrfachvergleich durchgeführt, entweder nach Bonferoni, bei Homogenität der Varianzen, oder nach Tamhane (T2), bei Inhomogenität.

3 Ergebnisse

3.1 Auswertung der einzelnen Zellschnittpräparate

In den folgenden beiden Tabellen sind die Ergebnisse der mikroskopischen Auszählung dargestellt. Es erfolgte eine Unterteilung der Präparate nach metastasierten und nicht-metastasierten Tumoren (Tab. 3 und Tab. 4).

In den beiden Tabellen ist jeweils, sowohl für den Proliferationsmarker PCNA als auch für den Proliferationsmarker Ki67, aufgelistet: (1) die Anzahl positiv markierter Zellen als Summe aus 20 Gesichtsfeldern (GF), (2) die Gesamtzahl der Zellen aus diesen 20 Gesichtsfeldern und (3) der Anteil positiv markierter Zellen an der Gesamtzellzahl in Prozent (Tab. 3 und Tab. 4).

Die Auswertungen der erhobenen Daten finden sich dann in den nachfolgenden Abschnitten, in denen gezeigt wird, welcher Zusammenhang zwischen Metastasierung, Alter und Tumorart im Hinblick auf den relativen Anteil der positiv markierten Zellen (in %) und auf die absolute Anzahl positiver Zellen (Summe aus 20 GF) besteht.

Tab. 3: Auswertung der einzelnen Präparate (metastasierte Tumore). Ausgezählt wurden jeweils 20 Gesichtsfelder. MW=Mittelwert; SD=Standardabweichung.

lfd. Nr.	PCNA			Ki67		
	Anzahl positiver Zellen	Gesamtzellzahl	Anteil positiver Zellen in %	Anzahl positiver Zellen	Gesamtzellzahl	Anteil positiver Zellen in %
1	657	978	67,2	812	1046	77,6
2	506	898	56,4	377	997	37,8
4	676	1032	65,5	975	1152	84,6
5	1289	1784	72,3	999	1268	78,8
6	674	1064	63,4	772	1586	48,7
7	998	1608	62,1	1028	1338	76,8
8	902	1185	76,1	1058	1211	87,4
9	1372	2241	61,2	1229	1899	64,7
10	1410	1986	71,0	943	1343	70,2
11	593	856	69,3	434	1148	37,8
12	805	1299	62,0	676	1160	58,3
27	337	417	80,8	107	404	26,5
29	1702	2062	82,5	390	1658	23,5
31	726	881	82,4	65	698	9,3
32	755	1087	69,5	257	1005	25,6
34	698	1122	62,1	179	941	19,0
37	926	1448	64,0	443	1239	35,8
42	1098	1323	83,0	599	963	62,2
(n=18)						
MW	895,8	1292,8	69,5	630,2	1169,8	51,4
SD	356,0	480,4	8,4	363,0	342,6	25,1

Tab. 4: Auswertung der einzelnen Präparate (nicht-metastasierte Tumore). Ausgezählt wurden jeweils 20 Gesichtsfelder. MW=Mittelwert; SD=Standardabweichung.

lfd. Nr.	PCNA			Ki67		
	Anzahl positiver Zellen	Gesamtzellzahl	Anteil positiver Zellen in %	Anzahl positiver Zellen	Gesamtzellzahl	Anteil positiver Zellen in %
13	726	1103	65,8	101	840	12,0
14	362	1221	29,7	914	1174	77,9
15	867	1415	61,3	810	1387	58,4
16	878	1317	66,7	618	1091	56,7
17	981	1363	72,0	541	999	54,2
18	177	570	31,1	115	554	20,8
19	232	341	68,0	144	426	33,8
20	4	323	1,2	30	325	9,2
21	839	1278	65,6	618	1091	56,7
22	1004	1450	69,2	649	1240	52,3
25	520	826	63,0	392	852	46,0
26	726	924	78,6	160	711	22,5
30	705	1030	68,5	330	990	33,3
35	1076	1268	84,9	416	1160	35,9
36	145	203	71,4	94	210	44,8
38	621	713	87,1	75	548	13,7
39	693	989	70,1	517	730	70,8
47	523	796	65,7	172	737	23,3
50	140	242	57,9	93	234	39,4
(n=19)						
MW	590,5	914,3	62,0	357,3	805,2	40,1
SD	329,0	416,6	20,5	275,9	352,1	20,0

3.2 Zusammenhang mit der Metastasierung

3.2.1 Prozentuale Anteile PCNA- und Ki67-positiver Zellen

Um den Zusammenhang mit der Metastasierung darzustellen, wurde für die beiden Proliferationsmarker (PCNA und Ki67) der durchschnittliche prozentuale Anteil positiv markierter Zellen in Abhängigkeit von der Metastasierung berechnet. 18 Präparate stammten von Patienten mit metastasierten Tumoren und 19 Präparate von Patienten mit nicht-metastasierten Tumoren (Tab. 5).

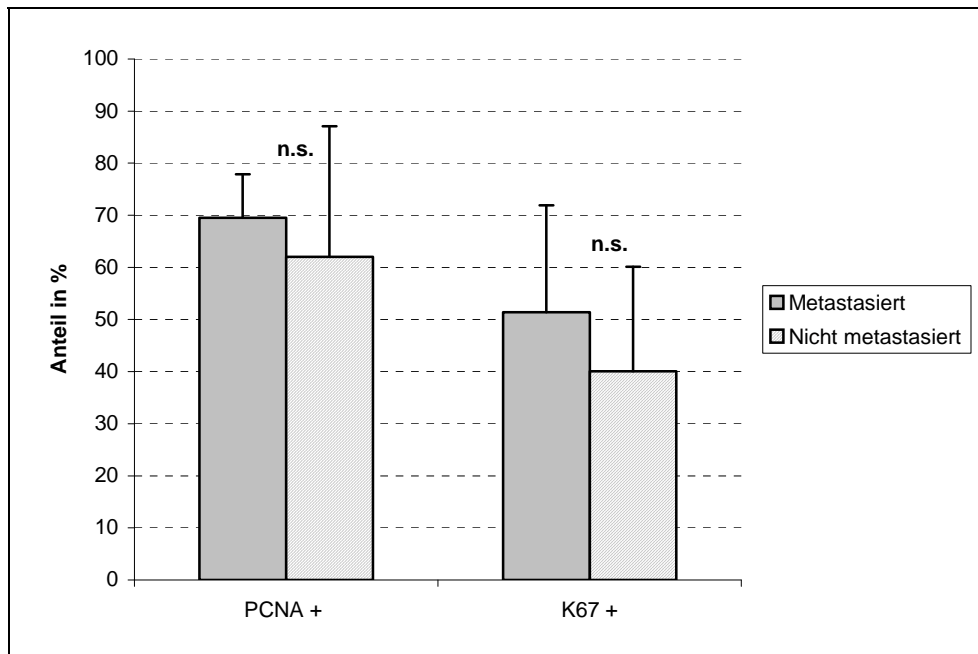
Beim Proliferationsmarker PCNA war der Anteil positiver Zellen an der Gesamtzellzahl statistisch signifikant höher als beim Proliferationsmarker Ki67. Dies galt sowohl für die metastasierten als auch für die nicht-metastasierten Tumore (Tab. 5).

Der Anteil positiv markierter Zellen war für beide Proliferationsmarker bei den Patienten mit nicht-metastasierten Tumoren etwas niedriger als bei den Patienten mit nachgewiesenen Metastasen. Für den Proliferationsmarker PCNA ergab sich ein durchschnittlicher Anteil von 62,0 (nicht-metastasiert) vs. 69,5 Prozent (metastasiert); für den Proliferationsmarker Ki67 fanden sich Werte von 40,1 vs. 51,4 Prozent (Tab. 5). Die Differenzen zwischen metastasierten und nicht-metastasierten Tumoren waren allerdings statistisch nicht signifikant (Abb. 3).

Tab. 5: Mittlerer prozentualer Anteil PCNA- und Ki67 positiver Zellen in Abhängigkeit von der Metastasierung des Tumors. n=Anzahl; MW=Mittelwert; SD=Standardabweichung; n.s. = nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

	metastasiert (n=18)		nicht metastasiert (n=19)		Unterschied met./nicht- met.	Gesamt (n=37)	
	MW	SD	MW	SD	Signifikanz	MW	SD
PCNA	69,5	8,4	62,0	20,5	n.s.	65,3	16,1
Ki67+	51,4	25,1	40,1	20,0	n.s.	45,6	23,0
Unterschied PCNA/Ki67 Signifikanz	p=0,014		p=0,003			p<0,001	

Abb. 3: Prozentualer Anteil positiver PCNA- und Ki67-Zellen bei metastasierten und nicht-metastasierten Tumoren. n.s. = nicht signifikant; PCNA+: PCNA-positive Zellen; Ki67+: Ki67-positive Zellen.



3.3 Abhängigkeit vom Alter

Um den Einfluss des Alters auf die beiden Proliferationsmarker zu untersuchen wurden die Patienten zunächst in drei Altersgruppen eingeteilt. Für diese Altersgruppen wurden anschließend die prozentualen Anteile PCNA- und Ki67-positiver Zellen ermittelt.

3.3.1 Prozentuale Anteile PCNA- und Ki67-positiver Zellen

Wiederum fanden sich für den Proliferationsmarker PCNA statistisch signifikant höhere Werte, außer bei der ältesten Gruppe. Zwischen den drei Altersgruppen ergaben sich allerdings keine statistisch signifikanten Unterschiede (Tab. 6).

Tab. 6: Mittlerer prozentualer Anteil positiver PCNA- und Ki67-Zellen in Abhängigkeit vom Alter der Patienten. n=Anzahl; MW=Mittelwert; SD=Standardabweichung; n.s. = nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

	<25 Jahre (n=14)		25-30 Jahre (n=14)		>30 Jahre (n=9)		Unterschied zwischen Alters- gruppen
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	Signifikanz
PCNA	64,6	17,1	66,4	20,3	66,1	4,3	n.s.
Ki67+	42,5	22,7	40,8	23,5	57,8	20,5	n.s.
Unterschied PCNA/Ki67	p=0,019		p=0,004		n.s.		

In der folgenden Tabelle ist der prozentuale Anteil der positiven PCNA-Zellen in Abhängigkeit vom Alter der Patienten sowie in Abhängigkeit von der Metastasierung dargestellt. Es sollte gezeigt werden, inwiefern sich in den drei Altersgruppen der positive PCNA-Anteil bei metastasierten und nicht-metastasierten Tumoren unterscheidet. Dabei konnte ein statistisch signifikanter Unterschied nur in der Gruppe der unter 25-jährigen Patienten nachgewiesen werden. Bei dieser Altersgruppe lag der Anteil positiver PCNA-Zellen bei den metastasierten Tumoren bei 71,9 Prozent, währenddessen dies bei den nicht-metastasierten Tumoren nur 46,3 Prozent waren (Tab. 7).

Tab. 7: Mittlerer prozentualer Anteil positiver PCNA-Zellen in Abhängigkeit vom Alter der Patienten. Vergleich: Metastasiert vs. nicht-metastasiert. n=Anzahl; MW=Mittelwert; SD=Standardabweichung; n.s. = nicht signifikant ($p \geq 0,05$)

Alter der Patienten	Metastasiert			Nicht metastasiert			Signifikanz
	n	MW	SD	N	MW	SD	
< 25	10	71,9	9,8	4	46,3	18,8	p=0,005
25 bis 30	4	67,8	6,5	10	65,8	24,1	n.s.
> 30	4	65,2	5,0	5	66,8	4,0	n.s.
Gesamt	18	69,5	8,4	19	62,0	20,5	n.s.

Da bei der jüngsten Altersgruppe (<25 J.) der Anteil der positiven PCNA-Zellen bei metastasierten Tumoren deutlich höher war als bei nicht-metastasierten, wurde geprüft, inwiefern sich dieser Parameter bei der Gruppe der unter 25-jährigen als Prädiktor für die Metastasierung eignet.

Zunächst wurde empirisch ein Grenzwert für die mutmaßliche Metastasierung festgelegt. Zu diesem Zweck wurden zunächst in der jüngsten Gruppe die Mittelwerte PCNA-positiver Zellanteile für metastasierte und nicht-metastasierte Tumore berechnet. Als Grenzwert wurde dann ein Wert gewählt, der in etwa zwischen diesen beiden Mittelwerten lag. Die Absicht dabei war, möglichst viele "richtig positive" und "richtig negative" Ergebnisse zu erhalten. Es wurde der Wert 60 als Grenzwert festgelegt (Tab. 8).

Die klinische Relevanz lässt sich aus der folgenden Tabelle ableiten, in der die einzelnen Patienten der jüngsten Altersgruppe aufgelistet sind. Würde man bei einem Mindestanteil von 60 Prozent positiver PCNA-Zellen eine Metastasierung annehmen, dann fände sich unter den vier Patienten mit nicht-metastasierten Tumoren ein Patient mit falsch positivem Befund (25%). Gleichzeitig fände sich unter den zehn Patienten mit

metastasierten Tumoren nur ein Patient mit einem PCNA-Anteil kleiner 60 Prozent bzw. mit einem falsch negativen Befund (10%) (Tab. 8).

Tab. 8: Mittlerer prozentualer Anteil positiver PCNA-Zellen bei Patienten < 25 Jahre. *falsch positiv; **falsch negativ.

lfd. Nr.	PCNA + (mittlerer prozentualer Anteil positiver Zellen)	Metastasiert
14	26,65	nein
16	66,67*	nein
18	31,05	nein
50	57,85	nein
	46,3 ± 18,8	
1	67,18	ja
2	56,35**	ja
10	71,00	ja
11	69,28	ja
27	80,82	ja
29	82,54	ja
34	62,21	ja
37	63,95	ja
42	82,99	ja
31	82,41	ja
	71,9 ± 9,8	

In der folgenden Tabelle sind der positive und negative Vorhersagewert sowie die Sensitivität und Spezifität in Bezug auf den empirisch gewählten Grenzwert dargestellt. Werte oberhalb des jeweiligen Grenzwertes gelten dabei als positives Testergebnis im Sinne einer vorhandenen Metastasierung (Tab. 9).

Tab. 9: Positiver und negativer Vorhersagewert, Sensitivität und Spezifität in Bezug auf den Grenzwert von 60 Prozent (prozentualer Anteil PCNA-positiver Zellen).

Grenzwert (PCNA-positive Zellen, pro- zentualer Anteil)	Angaben in Prozent mit 95%-Konfidenzintervall in Klammern			
	Positiv prädiktiver Wert	Negativ prädiktiver Wert	Sensitivität	Spezifität
60 %	90,0 (70,3-99,1)	75,0 (25,8-97,8)	90,0 (70,3-99,1)	75,0 (25,8-97,8)

Die gleichen Berechnungen wurden auch für den Proliferationsmarker Ki67 durchgeführt. Es zeigte sich, dass in den beiden höheren Altersgruppen (25-30 und >30) der Anteil der positiven Ki67-Zellen bei den metastasierten Tumoren deutlich größer war, wobei allerdings kein statistisch signifikantes Niveau erreicht wurde (Tab. 10). Da anzunehmen war, dass der Grund für die unzureichende statistische Signifikanz in der geringen Fallzahl lag (14 Patienten in der mittleren und 9 Patienten in der höchsten Altersgruppe), wurden die beiden Gruppen in Tab. 11 zusammengefasst.

Tab. 10: Mittlerer prozentualer Anteil positiver Ki67-Zellen in Abhängigkeit vom Alter der Patienten (3 Altersgruppen). Vergleich: Metastasiert vs. nicht-metastasiert. ⁽¹⁾p=0,055 ⁽²⁾p=0,063. n=Anzahl; MW=Mittelwert; SD=Standardabweichung; n.s. = nicht signifikant ($p \geq 0,05$)

Alter der Patienten	Metastasiert			Nicht metastasiert			Sign.
	n	MW	SD	N	MW	SD	
< 25	10	40,0	22,8	4	48,8	24,3	n.s.
25 bis 30	4	59,6	28,0	10	33,3	17,9	n.s. ⁽¹⁾
> 30	4	71,6	12,2	5	46,7	19,5	n.s. ⁽²⁾
Gesamt	18	51,4	25,1	19	40,1	19,9	n.s.

Nach Zusammenfassung der beiden Altersgruppen konnte gezeigt werden, dass der positive Ki67-Anteil bei den metastasierten Tumoren nicht nur zahlenmäßig deutlich größer war, sondern dass die Differenz auch statistische Signifikanz aufwies (65,6 vs. 37,8%; $p=0,004$) (Tab. 11).

Tab. 11: Mittlerer prozentualer Anteil positiver Ki67-Zellen in Abhängigkeit vom Alter der Patienten (2 Altersgruppen). Vergleich: Metastasiert vs. nicht-metastasiert. n=Anzahl; MW=Mittelwert; SD=Standardabweichung; n.s. = nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

Alter der Patienten	Metastasiert			Nicht metastasiert			Signifikanz
	n	MW	SD	N	MW	SD	
< 25	10	40,0	22,8	4	48,8	24,3	n.s.
≥ 25	8	65,6	21,0	15	37,8	18,9	p=0,004
Gesamt	18	51,4	25,1	19	40,1	19,9	n.s.

Um die klinische Relevanz der Differenzen aufzeigen zu können, sind in der folgenden Tabelle wiederum alle Patienten einzeln aufgelistet. Es wurde wiederum ein Grenzwert festgelegt, der etwa zwischen den Mittelwerten der Ergebnisse von metastasierten und nicht-metastasierten Tumoren lag (Tab. 11).

Bei einem angenommenen Ki67-Grenzwert von 50 Prozent ($>50\%$ = pos. Befund), fanden sich unter den 15 Patienten mit nicht-metastasierten Tumoren fünf mit einem höheren Wert bzw. mit einem falsch-positiven Befund (33,3%). Gleichzeitig wiesen zwei der acht Patienten mit metastasierten Tumoren einen falsch negativen Befund auf (25,0%) (Tab. 12).

Tab. 12: Mittlerer prozentualer Anteil positiver Ki67-Zellen bei Patienten ≥ 25 Jahre. *falsch positiv; **falsch negativ.

lfd. Nr.	Ki67 + (mittlerer prozentualer Anteil positiver Zellen)	Metastasiert
19	33,8	nein
20	9,23	nein
25	46,01	nein
35	35,86	nein
36	44,76	nein
38	13,69	nein
39	70,82*	nein
47	23,34	nein
30	33,33	nein
26	25,50	nein
13	12,02	nein
15	58,40*	nein
17	54,15*	nein
21	56,65*	nein
22	52,34*	nein
	37,8 \pm 18,9	
7	76,83	ja
8	87,37	ja
32	25,57**	ja
6	48,68**	ja
9	64,72	ja
4	84,64	ja
5	78,79	ja
12	58,28	ja
	65,6 \pm 21,0	

In der folgenden Tabelle sind der positive und negative Vorhersagewert sowie die Sensitivität und Spezifität in Bezug auf den empirisch gewählten Grenzwert dargestellt. Werte oberhalb des jeweiligen Grenzwertes gelten dabei als positives Testergebnis im Sinne einer vorhandenen Metastasierung (Tab. 13).

Tab. 13: Positiver und negativer Vorhersagewert, Sensitivität und Spezifität in Bezug auf den Grenzwert von 60 Prozent (prozentualer Anteil Ki67-positiver Zellen).

Grenzwert (PCNA-positive Zellen, pro- zentualer Anteil)	Angaben in Prozent mit 95%-Konfidenzintervall in Klammern			
	Positiv prädiktiver Wert	Negativ prädiktiver Wert	Sensitivität	Spezifität
50 %	54,6 (29,9-62,2)	83,3 (60,7-96,8)	75,0 (41,1-95,1)	66,7 (48,6-77,4)

3.4 Abhängigkeit von der Tumorart

Bei den 37 untersuchten Präparaten handelte es sich ausschließlich um nicht-seminomatöse Keimzell-Tumore (NSGCT). Unter diesen fanden sich sechs Präparate von Patienten, bei denen ein reines adultes Teratom vorlag. Diese sechs Patienten wurden in den folgenden Analysen den übrigen 31 Patienten gegenübergestellt.

Um den Einfluss der Tumorart (adultes Teratom vs. übrige NSGCT) auf die beiden Proliferationsmarker zu untersuchen wurden die Patienten zunächst in zwei entsprechende Gruppen eingeteilt. Für diese Gruppen wurden anschließend die prozentualen Anteile der PCNA- und Ki67-positiven Zellen ermittelt.

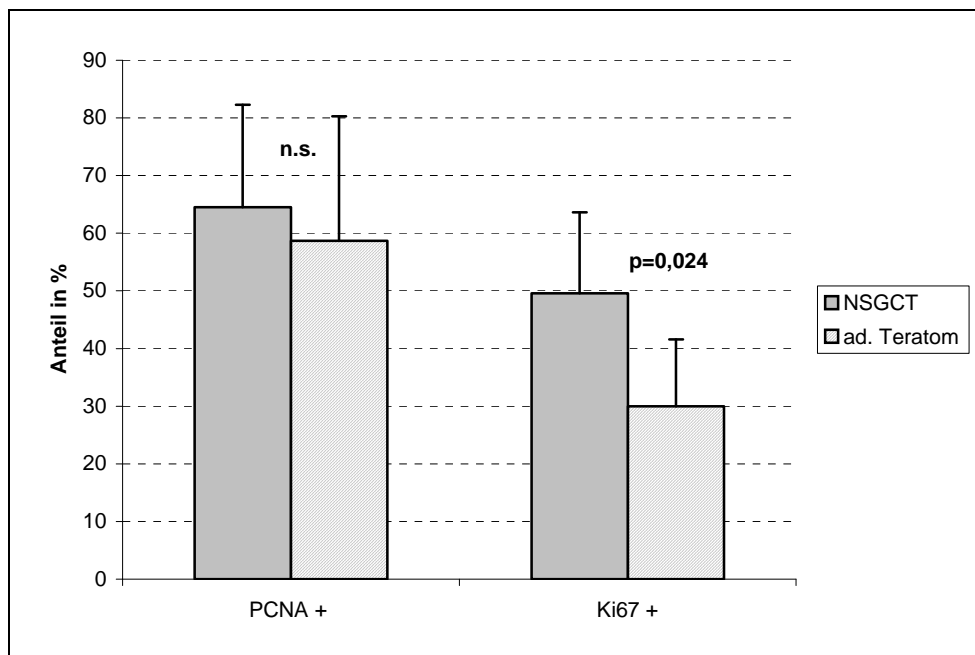
3.4.1 Prozentuale Anteile PCNA- und Ki67-positiver Zellen

Wiederum fanden sich für den Proliferationsmarker PCNA höhere Werte als für den Marker Ki67, wobei die Differenzen auch statistisch signifikant waren. Innerhalb der beiden Proliferationsmarker-Gruppen fanden sich signifikante Differenzen nur in Bezug auf den Proliferationsmarker Ki67. Adulte Teratome wiesen statistisch signifikant niedrigere Anteile Ki67-positiver Zellen auf als die übrigen NSGCT (29,1 vs. 48,8%; $p=0,024$) (Tab. 14 und Abb. 4).

Tab. 14: Mittlerer prozentualer Anteil positiver PCNA- und Ki67-Zellen in Abhängigkeit von der Tumorart (NSGCT oder adultes Teratom). n=Anzahl; MW=Mittelwert; SD=Standardabweichung; n.s. = nicht signifikant; Signifikanzniveau $p < 0,05$.

	NSGCT (n=31)		Adultes Teratom (n=6)		Unterschied NSGCT/ Teratom	Gesamt (n=37)	
	MW	SD	MW	SD	Signifikanz	MW	SD
PCNA	66,7	16,3	60,0	14,9	n.s.	65,6	16,4
Ki67+	48,8	23,3	29,1	12,5	$p=0,024$	45,6	23,0
Unterschied PCNA/Ki67 Signifikanz	$p=0,002$		$p=0,005$			$p<0,001$	

Abb. 4: Prozentualer Anteil PCNA- und Ki67-positiver Zellen in Abhängigkeit vom Tumortyp (NTSCG und adultes Teratom). n.s. = nicht signifikant; Signifikanzniveau $p < 0,05$.



In der folgenden Tabelle ist der prozentuale Anteil der PCNA-positiven Zellen in Abhängigkeit von der Tumorart sowie in Abhängigkeit von der Metastasierung dargestellt. Es sollte demonstriert werden, inwiefern sich bei den beiden Tumorarten der PCNA-

positive Anteil bei metastasierten und nicht-metastasierten Tumoren unterscheidet. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich bei den NSGCT keine wesentlichen Unterschiede zwischen metastasierten und nicht-metastasierten Tumoren ergaben. Unter den adulten Teratomen fanden sich keine metastasierten Tumore, so dass ein entsprechender Vergleich hier nicht möglich war (Tab. 15).

Tab. 15: Mittlerer prozentualer Anteil PCNA-positiver Zellen in Abhängigkeit vom Tumortyp (NSGCT oder adultes Teratom). Vergleich: Metastasiert vs. nicht-metastasiert. (*n.s.). n=Anzahl; MW=Mittelwert; SD=Standardabweichung; n.s. = nicht signifikant; Signifikanzniveau $p < 0,05$

Tumortyp	Metastasiert			Nicht metastasiert			Signifi- kanz
	n	MW	SD	n	MW	SD	
NSGCT	18	69,5	8,4	13	62,9*	23,2	n.s.
Adultes Teratom	0	-	-	6	60,0*	14,9	-
Gesamt	18	69,5	8,4	19	62,0	20,5	n.s.

Das Ergebnis im Hinblick auf den Proliferationsmarker Ki67 war analog zu den obigen Berechnungen. Der prozentuale Anteil positiver Ki67-Zellen zeigte im Wesentlichen keine Abhängigkeit von der Metastasierung, wobei auch hier wiederum die adulten Teratome, mangels metastasierten Tumoren, nicht verglichen werden konnten (Tab. 16).

Tab. 16: Mittlerer prozentualer Anteil Ki67-positiver Zellen in Abhängigkeit vom Tumortyp (NSGCT oder adultes Teratom). Vergleich: Metastasiert vs. nicht-metastasiert. *n.s. n=Anzahl; MW=Mittelwert; SD=Standardabweichung; n.s. = nicht signifikant; Signifikanzniveau $p < 0,05$.

Tumortyp	Metastasiert			Nicht metastasiert			Sign.
	N	MW	SD	N	MW	SD	
NSGCT	18	51,4	25,1	13	45,2*	21,1	n.s.
Adultes Teratom	0	-	-	6	29,1*	12,5	-
Gesamt	18	51,4	25,1	19	40,1	20,0	n.s.

4 Diskussion

Der Keimzelltumor ist die häufigste Krebsart bei jüngeren Männern zwischen 20 und 35 Jahren, mit ständig steigender Inzidenz. Die Gründe für die Zunahme der Häufigkeit sind nicht bekannt. In den letzten beiden Jahrzehnten hat sich die Inzidenz verdoppelt. Die Rate der jährlichen Zunahme liegt in Europa zwischen zwei und fünf Prozent (Bergstrom et al. 1996; Schmoll et al. 2004). In Deutschland erkranken derzeit pro Jahr ca. 4000 Männer an einem Hodentumor (Pottek et al. 2005). Erfreulicherweise steht der stark angestiegenen Zahl jährlicher Neuerkrankungen aber auch eine Reduktion der Mortalität gegenüber (Winter et al. 2005).

Während der letzten zwei Jahrzehnte hat sich der Hodentumor zum Musterbeispiel einer heilbaren Tumorerkrankung entwickelt. Die Heilungsraten für Hodentumoren in den frühen Stadien (Stadium I, IIA und IIB) liegen bei 98 bis 100 Prozent. Dies gilt unabhängig davon, ob als primäre Maßnahme eine aktive Therapie durchgeführt wird, wie zum Beispiel eine Chemotherapie, oder ob man sich für die Überwachungsstrategie (Surveillance) entscheidet, sofern beide Maßnahmen nach den derzeit gültigen Richtlinien durchgeführt werden (Spermon et al. 2002; Schmoll et al. 2004; Spermon et al. 2005; Krege et al. 2005).

Bei etwa 30 Prozent aller Patienten mit nicht-seminomatösen Hodentumoren im klinischen Stadium I sind okkulte Metastasen vorhanden, die im Falle der Surveillance zu einem Rezidiv führen würden. Diese Rezidive manifestieren sich meist in Form retroperitonealer Lymphknotenmetastasen. Würde man alle Patienten dieses Tumorstadiums adjuvant behandeln, wären folglich 70 Prozent übertherapiert. 70 Prozent der Patienten wären also bereits durch den primären Eingriff, die Orchiektomie, geheilt (Spermon et al. 2002). Tritt bei Patienten unter Surveillance ein Rezidiv auf, so beträgt die Heilungschance durch die Chemotherapie weiterhin nahezu 100 Prozent (Schmoll et al. 2004).

Durch die Vielfalt der therapeutischen Optionen ist die Entscheidung für die optimale Behandlung der Patienten komplizierter geworden. Dies betrifft vor allem Patienten in

frühen Tumorstadien, die oftmals übertherapiert werden, obgleich sie im Grunde bereits durch einen relativ kleinen Eingriff bereits geheilt wären (Schmoll et al. 2004).

Eine unabdingbare Grundlage für eine suffiziente Behandlung von Patienten mit Hodenkrebs, bilden die aktuellen Leitlinien zur Diagnostik und Therapie, wie sie von der European Germ Cell Cancer Consensus Group (EGCCCG) auf Grundlage der Leitlinien der German Testicular Cancer Study Group (GTCSG) sowie zweier weiterer Leitlinien verfasst wurden (Royal College of Radiologist' Clinical Oncology Network, 2000; Laguna et al. 2001; Souchon et al. 2002; Schmoll et al. 2004).

Das weiterführende Ziel ist es nunmehr, jene Methode zur Anwendung kommen zu lassen, die gleichermaßen die beste Methode für die Heilung ist, aber auch die geringste Belastung für den Patienten darstellt. Hierbei ist bereits heute ein umfangreiches Erfahrungsgut aus verschiedenen klinischen Studien verfügbar (Schmoll et al. 2004). Von besonderer Bedeutung ist es dabei auch, Prädiktoren für eine okkulte Metastasierung zu finden und zu nutzen, um Patienten mit nicht-seminomatösen Hodentumoren im klinischen Stadium I in zwei Gruppen einteilen zu können, damit jene Patienten besser zu identifizieren sind, die einer adjuvanten Therapie unterzogen werden sollten.

Zu den bedeutsamsten prognostischen Indikatoren für eine okkulte Metastasierung zählt die vaskuläre Invasion des Tumors. Ohne adjuvante Therapie entwickeln 48 Prozent der Patienten mit vaskulärer Infiltration Metastasen. Liegt eine vaskuläre Invasion nicht vor, beträgt das Risiko okkulter Metastasen lediglich 14 bis 22 Prozent. Bereits mit Hilfe dieses Markers lässt sich somit eine Gruppe mit hohem Risiko (High-Risk-Gruppe) von einer Gruppe mit niedrigem Risiko (Low-Risk-Gruppe) abgrenzen (Read et al. 1992; Heidenreich et al. 1998; Albers et al. 2003).

Bei Patienten der Low-Risk-Gruppe, also bei den Patienten ohne vaskuläre Invasion, ist in 78 bis 86 Prozent der Fälle eine weitergehende Therapie über die Orchiektomie hinaus nicht erforderlich. Diese Patienten können als potentiell geheilt betrachtet werden (Klepp et al. 1997; Ondrus et al. 1998).

Gemäß den aktuell geltenden Leitlinien wird, bei Patienten ohne vaskuläre Invasion des Primärtumors, heute in erster Linie als Standardoption eine Surveillance empfohlen. Eine Chemotherapie erfolgt nur dann, wenn Gründe dagegen vorliegen. Kommen weder Chemotherapie noch Surveillance in Frage wird eine nervenschonende retroperitoneale Lymphknotenentfernung vorgenommen. Bei der Hochrisikogruppe, also bei den Patienten mit vaskulärer Invasion, gilt als derzeitiger Standard die adjuvante Chemotherapie. Als Alternativen gelten die nervenschonende retroperitoneale Lymphknotenentfernung und die Surveillance. Durch die Chemotherapie bleiben 97 Prozent der Hochrisikogruppe rezidivfrei. Die Gesamtheilungsrate beträgt bei diesen Patienten ebenfalls über 99 Prozent (Read et al. 1992; Schmoll et al. 2004).

Der Nachteil bei der adjuvanten Behandlung der Hochrisiko-Patienten ist, dass bei etwa der Hälfte der Patienten unnötigerweise eine Chemotherapie durchgeführt wird, und diese Patienten deshalb ohne Nutzen dem Risiko unerwünschter Wirkungen ausgesetzt sind (Pont et al. 1996; Strumber et al. 2002). Es kann durch die Behandlung des Hodentumors zu sexuellen Funktionsstörungen und Fertilitätsstörungen kommen, wobei diese Effekte allerdings nicht zwingend mit der Chemotherapie in Verbindung stehen müssen (Hartmann et al. 1999; Bohlen et al. 2001). Vermutlich handelt es sich im Hinblick auf die Chemotherapie um ein dosisabhängiges Phänomen (DeSantis et al. 1999). Neben diesen möglichen Folgen besteht möglicherweise auch ein Risiko für die Entwicklung sekundärer Malignome, vornehmlich einer Leukämie, wobei dieses Risiko in der Vergangenheit deutlich überschätzt worden war. Zum Teil geht man heute sogar davon aus, dass diesbezüglich kein signifikant erhöhtes Risiko besteht (Bokemeyer und Schmoll, 1993; Travis et al. 1997; Travis et al. 2000). Im Zusammenhang mit möglichen Nebenwirkungen einer Chemotherapie sollte jedoch berücksichtigt werden, dass Cisplatin noch bis zu 20 Jahre im Körper nachweisbar ist, wie in aktuelleren Studien gezeigt werden konnte; potentielle Spätfolgen sollten demgemäß in die Überlegungen mit einbezogen werden, wenn es darum geht, sich entweder für die Surveillance oder aber für die adjuvante Chemotherapie zu entscheiden (Potttek et al. 2005).

Trotz möglicher Nebenwirkungen, die mit der Chemotherapie verbunden sein können, sollte berücksichtigt werden, dass für Hochrisiko-Patienten mit einer Rezidivrate von

fast 50 Prozent die Surveillance-Strategie einen starken psychologischen Stress darstellen würde. Außerdem wäre die Therapie im Falle des Rezidives aufwändiger. Nichtsdestotrotz bleibt festzustellen, dass auch bei Hochrisiko-Patienten im Falle des Rezidives während der Surveillance eine Heilungschance von über 98 Prozent besteht (Schmoll et al. 2004).

Um die Sicherheit der Prognose bei der Einteilung in Hoch- und Niedrig-Risikogruppe zu erhöhen, muss weiterhin nach prädiktiven Faktoren für die okkulte Metastasierung bzw. für deren Ausschluss gesucht werden. Vorhandene prognostische Faktoren sollten in die Entscheidungsprozesse mit einbezogen werden.

Neben der weiter oben bereits erwähnten vaskulären Invasion als wichtigem Prädiktor der okkulten Metastasierung, kann heute, als weiterer prognostischer Marker, der Anteil embryonaler Karzinomzellen am gesamten Tumolvolumen betrachtet werden. Je größer dieser Anteil ist, desto größer ist auch das Risiko okkulten Metastasen. Bei Patienten mit einem überwiegenden embryonalen Tumorzellanteil ist das Risiko mit ca. 30 Prozent etwa doppelt so hoch wie bei den übrigen Patienten, mit nicht-überwiegendem embryonalen Zellanteil (Moul et al. 1994; Sweeney et al. 2000). Bei Patienten mit Teratomen oder einem hohen Teratomanteil im Primärtumor hingegen ist das Risiko okkulten Metastasen vermindert (Alexandre et al. 2001).

Nicht unberücksichtigt bleiben sollte auch der CT-Befund. Zwar kann der retroperitoneale Lymphknotenstatus nur mit einer Wahrscheinlichkeit von etwa 70 Prozent richtig beurteilt werden, da normal große Lymphknoten mit Metastasenbefall im bildgebenden Verfahren unerkannt bleiben (Krug et al. 1999). Jedoch kann durch die Kombination mit anderen Prädiktoren die prognostische Präzision deutlich gesteigert werden. So konnte durch die gleichzeitige Berücksichtigung von CT-Befund, embryonalem Anteil sowie der Proliferationsrate des Tumors mittels des Markers Ki67 eine Gruppe mit einem extrem niedrigen Risiko selektiert werden. Tatsächlich fand sich im Rahmen dieser Studie unter den 41 Niedrig-Risiko-Patienten nur ein Fall mit okkulten Metastasen. Insgesamt waren im Rahmen dieser Studie 91 Patienten untersucht worden. Der Low-Risk-Gruppe waren Patienten mit folgenden Befunden zugeordnet worden: 1.) Embryonales Ca-Volumen < 2 ml und Lymphknotendurchmesser im CT < 10 mm und

Ki67-Anteil < 90 Prozent oder 2.) Embryonales Ca-Volumen > 2 ml und Lymphknotendurchmesser im CT < 3 mm und Ki67-Anteil < 80 Prozent (Leibovitch et al. 1998).

Die Zell-Proliferationsmarker PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) und Ki67 (Ki67-Antigen) scheinen viel versprechende Prädiktoren einer okkulten Metastasierung bei Patienten mit Hodentumoren zu sein (Albers et al. 1995; Hori et al. 1997). Ziel unserer Studie war es, die Bedeutung dieser beiden Marker bei Patienten mit nicht-seminomatösen Hodentumoren im klinischen Stadium I zu untersuchen, um die Wertigkeit bei der Differenzierung zwischen Hoch- und Niedrig-Risikopatienten zu evaluieren. Ferner wurden auch mögliche Einflussfaktoren wie zum Beispiel das Alter untersucht, um zu zeigen, inwiefern möglicherweise Zusammenhänge bestehen, die für die Differenzierung der beiden Gruppen wichtig sein könnten.

4.1 Zusammenhang zwischen Proliferation und Metastasierung

Um den Zusammenhang zwischen Proliferation und Metastasierung zu zeigen, wurden die Präparate von 18 Patienten mit metastasierten und 19 Patienten mit nicht-metastasierten Tumoren miteinander verglichen.

Der Anteil markierter PCNA- und Ki67-positiver Zellen war bei den metastasierten Tumoren jeweils etwas größer als bei den nicht-metastasierten (PCNA: 69,5 vs. 62,0%; Ki67: 51,4 vs. 40,1%). Allerdings waren diese Differenzen statistisch nicht signifikant. Dies deutet zunächst scheinbar darauf hin, dass sich keiner der beiden Proliferationsmarker für eine Differenzierung zwischen metastasierten und nicht-metastasierten Tumoren eignet. Die fehlende statistische Signifikanz könnte allerdings zum Beispiel auch auf die eher geringe Patientenzahl in den beiden Vergleichsgruppen zurückzuführen sein. Es ist jedoch anzunehmen, dass in unserem Fall eher andere Faktoren bzw. Einflussgrößen für die fehlende statistische Signifikanz verantwortlich waren. Tatsächlich konnten wir zeigen, dass das Alter der Patienten einen ganz bedeutenden Einfluss auf die Ergebnisse hat. Auf die Einzelheiten hierzu soll jedoch erst in den weiter unten folgenden Abschnitten noch näher eingegangen werden.

In der Literatur finden sich bisher nur sehr wenige Studien, deren Ziel es war, mit Hilfe von Proliferationsmarkern eine bessere Differenzierung zwischen High-Risk- und Low-Risk-Patienten mit nicht-seminomatösen Hodentumoren im klinischem Stadium I zu erreichen bzw. um mittels derartiger Marker eine okkulte Metastasierung besser vorherzusagen zu können. Meist wurde hierbei der Marker Ki67 untersucht, seltener der Marker PCNA.

4.1.1 Ki67

Bereits im Jahr 1995 konnte erstmalig gezeigt werden, dass bei Patienten mit okkulten Metastasen der durchschnittliche Ki67-Anteil mit 80,4 Prozent statistisch signifikant höher war als bei den nicht-metastasierten Tumoren, mit einem Anteil von 66,1 Prozent [$p=0,003$]. Es war zwar nicht möglich, eine okkulte Metastasierung mit hinreichender Genauigkeit zu bestimmen, weil die Zahl der richtig positiven Befunde zu gering war; doch die Vorhersagequote der richtig negativen Befunde lag bei 87 Prozent, wenn man einen Ki67-Anteil von 80 Prozent als Grenzwert festlegte (Albers et al. 1995a).

Dass dieses Ergebnis mit dem empirisch festgelegten Ki67-Anteil von 80 Prozent als Grenzwert für einen negativen bzw. positiven Befund nicht generell auf andere Datenerhebungen oder gar auf die praktische Anwendung übertragbar ist, zeigt der Vergleich mit unseren Studienergebnissen. Hier lagen schon die durchschnittlichen Ki67-Anteile sowohl bei den metastasierten als auch bei den nicht-metastasierten Tumoren deutlich niedriger (51,4 in unserer Studie vs. 80,4 bzw. 40,1 in unserer Studie vs. 66,1). Würde man für die Patienten unserer Studie ebenfalls einen Grenzwert von 80 Prozent zugrunde legen, käme man zu folgendem Resultat: Es würde sich zwar ein sehr hoher positiver prädiktiver Wert ergeben (98,6%), diesem stünde jedoch ein negativ prädiktiver Wert von nur 54 Prozent gegenüber. Entsprechend fände sich eine Spezifität von 99,7 Prozent und eine Sensitivität von nur 17,5 Prozent.

In der oben zitierten Studie (Albers et al. 1995a) wies keiner der Patienten mit einem Ki67-Anteil unterhalb von 42 Prozent okkulte Metastasen auf. Dies traf für die

Ergebnisse unserer Studie nicht zu. Vielmehr fanden sich bei 10 der insgesamt 37 Patienten okkulte Metastasen, beim Grenzwert von 42 Prozent. Ein unterer Grenzwert für den sicheren Ausschluss okkulten Metastasen ließ sich anhand unserer Ergebnisse nicht festlegen.

In einer weiteren Publikation wurde ebenfalls über signifikante Unterschiede zwischen metastasierten und nicht-metastasierten Hodentumoren (NSGCT) des klinischen Stadiums I berichtet. Wiederum wiesen die metastasierten Tumore mit einem durchschnittlichen Ki67-Anteil von 80,2 Prozent höhere Werte auf als die nicht metastasierten Tumoren, mit einem Anteil von 66,3 Prozent ($p=0,003$). Die Sensitivität, also der Anteil der Patienten mit mutmaßlich okkulten Metastasen an allen Patienten, die tatsächlich auch Metastasen aufwiesen, war hierbei mit 82 Prozent allerdings deutlich höher als in der vorausgegangenen Studie mit nur 42 Prozent. Jedoch war dafür nun die Spezifität, also der Anteil der negativen Prognosen an den tatsächlich metastasenfreien Patienten, mit 69 Prozent geringer (vs. 87% in der früheren Studie). Keiner der Patienten mit einem Ki67-Anteil unterhalb von 52 Prozent wies in dieser Studie okkulte Metastasen auf (Albers et al. 1995b). In unserer Studie hingegen fanden sich noch bei neun der 18 Patienten mit metastasierten Tumoren Ki67-Anteile unterhalb 52 Prozent.

Wiederum zeigt sich auch in Bezug auf diese Studie, dass die Ergebnisse nicht direkt miteinander verglichen werden können. Zum Einen hängen die Sensitivität und die Spezifität davon ab, bei welchem prozentualen Anteil positiv markierter Zellen der jeweilige Grenzwert für eine mutmaßliche Metastasierung festgelegt wird, zum Anderen scheinen jedoch auch weitere Faktoren eine Rolle zu spielen. So ergaben sich zum Beispiel in unserer Studie Hinweise, welche die Vermutung nahelegen, dass das Alter der Patienten einen Einfluss auf den Anteil positiv markierter PCNA- bzw. Ki67-Zellen hat. Auf die Einzelheiten wird weiter unten näher eingegangen.

Eine dritte Publikation der Autorengruppe um Albers kommt zu nahezu identischen Resultaten, wie sie in den beiden beschriebenen Studien bereits dargestellt wurden. Aufgrund der Daten in diesen drei Publikationen ist anzunehmen, dass es sich im Wesentlichen um ein identisches Patientengut handelte. Dies erklärt auch die große Ähnlichkeit der Ergebnisse. Wiederum wurde auch hier über eine statistisch signifikante Differenz der durchschnittlichen Ki67-Anteile berichtet, die bei den metastasierten

Tumoren bei 80,2 Prozent und bei den nicht metastasierten Tumoren bei 66,3 Prozent lag ($p=0,003$) (Albers et al. 2005c).

In einer früher durchgeführten Studie wurden von der Autorengruppe um Albers insgesamt etwas niedrigere Ki-67-Anteile gefunden; bei den metastasierten Tumoren 75,1 und bei den nicht-metastasierten Tumoren 51,5 Prozent ($p=0,02$). Noch immer lagen diese Ergebnisse allerdings deutlich höher als in unserer Studie mit 51,4 und 40,1 Prozent. Bei einem Grenzwert von 70 Prozent ergaben sich eine Sensitivität von 86 und eine Spezifität von 60 Prozent. Der negative Vorhersagewert lag bei 88 und der positive Vorhersagewert bei 55 Prozent (Albers et al. 1997).

Im Gegensatz zu Albers et al. konnte die Gruppe um Heidenreich nicht zeigen, dass bei Patienten mit Hodentumoren (NSGCT) im Stadium I der Ki67-positive Anteil im Falle einer okkulten Metastasierung signifikant erhöht ist. Übereinstimmend mit unserem Ergebnis konnte in zwei Studien von Heidenreich et al. für diesen Tumor-Proliferationsmarker keine prognostische Signifikanz aufgezeigt werden (Heidenreich et al. 1997; Heidenreich et al. 1998; Heidenreich et al. 1999). Heidenreich et al. (1997) ermittelten bei den metastasierten Tumoren einen Ki67-positiven Anteil von 55,0 Prozent und den nicht-metastasierten einen Anteil von 41,2 Prozent. Dieses Ergebnis ist gleich unseren eigenen Beobachtungen (51,2 vs. 40,1%). Heidenreich et al. (1997) vermuten als Ursache für diese Diskrepanz methodische Faktoren. Insbesondere wiesen sie darauf hin, dass es in Abhängigkeit des Trocknungsverfahrens bzw. in Abhängigkeit von der Erhitzungskapazität und -Dauer zu einer Intensivierung der Färbung kommen könne. Dieser Effekt konnte in früheren Untersuchungen auch tatsächlich nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass in sich Abhängigkeit der Erhitzungsdauer im Mikrowellengerät die Ki67-Färbung signifikant erhöht (Munakata und Hendricks 1993). Außerdem wiesen Heidenreich et al. auf die Untersucher-abhängigen Unterschiede bei der Auswertung hin. Die Autoren gingen davon aus, dass es bei verschiedenen Untersuchern tatsächlich auch zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen könne. Inwiefern dies jedoch tatsächlich zutrifft bleibt eher spekulativ. Entscheidender scheint zu sein, dass das Verteilungsmuster der Tumore bei Albers et al. nicht dem zu erwartenden Bild entsprach. Tatsächlich wiesen die Tumore bei Albers nur in 27 Prozent der Fälle einen

Dottersacktumor-Anteil auf. Gemäß der Testicular Cancer Intergroup Study wäre jedoch ein Anteil von 79 Prozent beim pathologischen Stadium I bzw. ein Anteil von 66 Prozent beim Stadium II zu erwarten (Heidenreich et al. 1999).

Insgesamt scheint eine Kritik an den Studienergebnissen von Albers et al. tatsächlich gerechtfertigt zu sein; man kann die Ergebnisse demnach durchaus in Frage stellen. Obgleich jedoch, sowohl in der Studie von Heidenreich als auch in unserer Studie, kein signifikanter Unterschied zwischen metastasierten und nicht-metastasierten Tumoren bestand, scheint die Schlussfolgerung von Heidenreich et al. dennoch fraglich, die besagt, dass dem Parameter Ki67 kein prognostischer Wert zukommt. Wie weiter unten noch festgestellt werden wird, spielt nämlich bei der Beurteilung der Faktor "Alter" offensichtlich eine entscheidende Rolle. Dieser Faktor wurde weder in den Studien von Albers noch in den Studien von Heidenreich berücksichtigt; es geht überhaupt aus keiner der bisher vorliegenden Untersuchungen das Alter der Patienten hervor.

4.1.2 PCNA

Wie schon für den Proliferationsmarker Ki67 konnten in unserer Studie auch in Bezug auf den Marker PCNA zunächst (bei nicht-altersdifferenzierter Betrachtung) keine signifikanten Ergebnisse gezeigt werden; die prozentualen Anteile PCNA-positiver Zellen wiesen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen metastasierten und nicht-metastasierten Tumoren auf.

In der Literatur liegen hinsichtlich des Proliferationsmarkers PCNA als prognostischem Parameter für Hodentumoren bisher nur spärliche Hinweise vor. Albers et al. (1995) stellten jedoch fest, dass diesem Marker bei nicht-seminomatösen Hodentumoren im klinischen Stadium I keine prognostische Bedeutung zukommt. Für Seminome konnte allerdings gezeigt werden, dass sowohl der positive Ki67-Anteil als auch der positive PCNA-Anteil bei metastasierten Tumoren größer ist als bei nicht-metastasierten (Hori et al. 1997). Über die prognostische Relevanz dieses Sachverhalts wurden keine expliziten Angaben gemacht, wenngleich dieser eine Interpretation dahingehend zuließe.

Auch für andere Tumorarten konnte gezeigt werden, dass der Proliferationsmarker PCNA sich als prognostischer Parameter in Bezug auf Metastasen eignet. So konnte zum Beispiel beim colorektalen Karzinom festgestellt werden, dass metastasierte Tumore einen wesentlich höheren Anteil PCNA-positiver Zellen aufwiesen als nicht-metastasierte (94 vs. 29%) (Yue et al. 2003). Auch für das Magenkarzinom konnte ein solcher Zusammenhang nachgewiesen werden. Hier fand man bei den metastasierten Tumoren einen PCNA-positiven Zellanteil von 48 Prozent, der doppelt so hoch war wie bei den nicht-metastasierten Tumoren mit 24 Prozent (Isozaki et al. 1996). Ähnliche Korrelationen konnten auch für das orale Plattenepithelkarzinom und für das Ösophaguskarzinom (Dabrowski et al. 2001; Myong et al. 2006) sowie für das Larynxkarzinom gezeigt werden (Sarac et al. 1998; Dobros et al. 1998). In allen Fällen wiesen metastasierte Tumore etwa doppelt so hohe Anteile PCNA-positiver Zellen auf wie nicht metastasierte. Neben diesen Beispielen einer positiven Korrelation zwischen Metastasierung und PCNA gibt es allerdings auch Untersuchungen, in welchen ein solcher Zusammenhang nicht aufgezeigt werden konnte. So ergab sich zum Beispiel in Bezug auf das Ovarialkarzinom keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Metastasierung und dem Anteil PCNA-positiver Zellen (Wu et al. 1998). Dies gibt Hinweise darauf, dass sich Keimzelltumoren in Bezug auf PCNA-positive Zellen und Metastasierung generell anders verhalten als Plattenepithel- oder Adenokarzinome.

Der Grund, warum in unserer Studie, aber auch in der Studie von Albers et al. (1995) keine statistische Signifikanz gezeigt werden konnte, ist vermutlich wiederum dadurch bedingt, dass bestimmte Faktoren beim Patientenkollektiv eine Rolle spielen, die bei der Interpretation der Befunde berücksichtigt werden müssen. Auf die genauen Einzelheiten wird in den folgenden Abschnitten näher eingegangen.

4.1.3 Zusammenhang zwischen Proliferationsmarkern und Alter

Wir konnten zeigen, dass für die beiden Proliferationsmarker PCNA und Ki67 eine Abhängigkeit vom Alter der Patienten besteht.

4.1.3.1 PCNA und Alter

Für den Marker PCNA konnte gezeigt werden, dass signifikante Unterschiede zwischen metastasierten und nicht-metastasierten Tumoren nur bei Patienten bestehen, die jünger als 25 Jahre sind. In dieser Altersgruppe fand sich bei den metastasierten Tumoren im Mittel ein deutlich größerer Anteil PCNA-positiver Zellen als bei den nicht-metastasierten Tumoren (71,9 vs. 46,3%; $p=0,005$). Bei den 25 bis 30-jährigen und den über 30-jährigen Patienten hingegen, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen metastasierten und nicht metastasierten Tumoren gefunden werden. Die positiven Zellanteile lagen hier bei allen Patientengruppierungen innerhalb eines engen Bereiches zwischen ca. 66 und 68 Prozent. Der prozentuale Anteil PCNA-positiver Zellen scheint sich also bei Patienten ab 25 Jahren nicht als Prädiktor für eine Metastasierung zu eignen.

Bei einem Grenzwert PCNA-positiver Zellen von 60 Prozent in Kombination mit einem Alter unter 25 Jahren konnte festgestellt werden, dass der positiv prädiktive Wert mit 90 Prozent sehr hoch war. Inwiefern dies auch für den negativ prädiktiven Wert zutrifft wäre in weiteren Studien zu überprüfen, da in unserem Patientengut nur vier Patienten hierfür berücksichtigt werden konnten (nur $n=4$ Pat. < 25 Jahre und PCNA-Anteil $< 60\%$), und insofern eine sinnvolle Berechnung nicht möglich war.

Der Zusammenhang zwischen dem Tumormarker PCNA und dem Alter ist in den bisherigen Studien mit Hodentumoren noch nicht berücksichtigt worden. Für die Interpretation von Studienergebnissen dürfte er jedoch von großer Bedeutung sein. Die Beobachtung der Altersabhängigkeit bietet eine plausible Erklärung, warum in manchen Fällen kein statistischer Unterschied zwischen metastasierten und nicht-metastasierten Tumoren gezeigt werden kann und warum die Ergebnisse verschiedener Studien zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen. Befinden sich nämlich in einem Studienkollektiv viele Patienten, die älter als 25 Jahre sind, wäre zu erwarten, dass man bei undifferenzierter Betrachtung keine signifikanten Unterschiede aufzeigen kann. Tatsächlich war dies auch bei unserem Patientenkollektiv der Fall; bei Betrachtung der Gesamtheit aller Patienten konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen metastasierten und nicht-metastasierten Tumoren nicht gezeigt werden, wohl aber bei den jüngeren Patienten als Subgruppe.

Die Frage, weshalb sich die Tumorproliferationsraten bzw. die PCNA-positiven Zellanteile nur bei jüngeren Patienten in Abhängigkeit von der Metastasierung unterscheiden, bleibt unbeantwortet. Es konnten, auch im Hinblick auf andere Tumorarten, keine Studien gefunden werden, in welchen eine Differenzierung der Daten, wie in unserem Fall, zur Anwendung kam; es fand kein Vergleich zwischen metastasiert und nicht-metastasiert in verschiedenen Altersgruppen statt. Zwar gibt es Hinweise, die eine Abhängigkeit zwischen der PCNA-Expression und dem Alter aufzeigen, jedoch bieten diese keine echten Erklärungsmodelle zur Beantwortung der Kernfrage. Hinzu kommt, dass offensichtlich die Art des Tumors bzw. des Untersuchungsmaterials darüber entscheidet, ob mit zunehmendem Alter die PCNA-Expression zu- oder abnimmt. So wurde zum Beispiel bei melanozytischen Hautnaevi mit zunehmendem Alter eine Verminderung der Proliferationsrate bzw. der PCNA-Expression festgestellt (Tu et al. 1993). Bei Magenkarzinomen hingegen, konnte eine solche Differenzierung zwischen jungen und alten Patienten nicht gezeigt werden (Maehara et al. 1996). Eine Untersuchung an Patienten mit Gingivitis ergab hingegen, dass ältere Patienten eine höhere PCNA-Expression aufwiesen als jüngere Gingivitis-Patienten. Man vermutete, dass der Zellzyklus bei älteren Patienten verlangsamt sein könnte und aus diesem Grund die

Dauer der PCNA-positiven Phase verlängert wäre (Celenligil-Nazliel et al. 2000). Davon abgesehen, dass es vermutlich vom jeweiligen pathologischen Substrat abhängt, ob eher jüngere oder eher ältere die höhere PCNA-Expression aufweisen, ergeben sich aus den wenigen vorliegenden Studien, die auf die Altersabhängigkeit abzielen, keine Antworten auf die Frage der Marker-Expression in Abhängigkeit von der Metastasierung. Zwar konnte in der Magenkarzinomstudie gezeigt werden, dass jüngere Patienten undifferenziertere Tumore aufwiesen und deshalb vermutlich auch die Metastasierungsrate höher war, jedoch zeigte sich hinsichtlich der PCNA-Expression, wie bereits oben erwähnt, kein altersbezogener Unterschied (Maehara et al. 1996). Dies könnte jedoch daran gelegen haben, dass nur zwischen jung und alt und nicht gleichzeitig auch noch zwischen metastasierten und nicht-metastasierten Tumoren differenziert wurde, wie dies in unserer Studie der Fall war. Unabhängig davon wäre es jedoch durchaus denkbar, dass auch bei Hodentumoren jüngere Patienten eher weniger differenzierte Tumoren aufweisen als ältere, und dass deshalb die PCNA-Expression bei metastasierten Tumoren höher ist als bei den nicht-metastasierten. Es stellt sich dann allerdings zwangsläufig die Frage, warum die PCNA-Expression nicht grundsätzlich bei metastasierten Tumoren größer ist, also auch bei den älteren Patienten mit Metastasen.

4.1.3.2 Ki-67 und Alter

Auch für den Proliferationsparameter Ki67 konnte gezeigt werden, dass eine Differenzierung zwischen metastasierten und nicht-metastasierten Tumoren von der Altersgruppe abhängig ist. Allerdings fanden sich für diesen Parameter die signifikanten Unterschiede in der Gruppe der Patienten, die älter als 25 Jahre waren. Bei jüngeren Patienten konnten statistisch signifikante Unterschiede zwischen metastasierten und nicht-metastasierten Tumoren nicht gezeigt werden.

In unserem Patientenkollektiv fand sich bei den Patienten ab 25 Jahren ein deutlich höherer Anteil positiver Zellen bei den metastasierten Tumoren im Vergleich zu den nicht-metastasierten (65,6 vs. 37,8; $p=0,004$). Bei den jüngeren Patienten war die Differenz zwischen metastasierten und nicht-metastasierten Tumoren deutlich geringer und

statistisch nicht signifikant (40,0 vs. 48,8). Ebenso zeigte sich bei Betrachtung aller Patienten, also ohne Berücksichtigung des Alters, kein statistisch signifikanter Unterschied. Dies könnte erklären, warum sich in manchen Studien der Proliferationsmarker Ki67 scheinbar nicht als prognostischer Parameter für eine okkulte Metastasierung eignete; in keiner der bisher vorliegenden Studien wurde eine altersdifferenzierte Analyse durchgeführt.

Eine altersdifferenzierte Betrachtung scheint also geboten, wenn man den Proliferationsmarker Ki67 als prognostischen Marker der Metastasierung verwenden möchte. Wie das Ergebnis erklärt werden kann, scheint jedoch ungleich schwieriger zu sein. Es ist überraschend und irritierend, dass sich die beiden Proliferationsmarker PCNA und Ki67 vollkommen konträr verhalten. Während beim Marker PCNA jüngere Patienten mit metastasierten Tumoren die höchsten Werte aufwiesen, waren es beim Marker Ki67 die älteren. Dass jeweils die metastasierten Tumore höhere Tumormarker-Anteile aufwiesen erscheint dabei noch plausibel. Man würde jedoch annehmen, dass die Tumorproliferation bei den jeweiligen Altersgruppen gleich sein muss. Demgemäß würde man erwarten, dass sich entweder bei den älteren oder bei den jüngeren Patienten eine höhere Proliferationsrate ergibt. Tatsächlich aber konnte gerade dies anhand unserer Ergebnisse nicht gezeigt werden. In Bezug auf den Marker PCNA scheinen die jüngeren Patienten eine höhere Proliferation aufzuweisen, in Bezug auf den Marker Ki67 die älteren.

In der Literatur finden sich wiederum nur wenige Studien, die auf den Zusammenhang zwischen Tumor- bzw. Proliferationsmarker Ki67 und Alter eingehen. Und wiederum lassen sich aus den vorliegenden Ergebnissen keine Antworten auf die Frage ableiten, wie der altersbezogene Unterschied zwischen metastasierten und nicht-metastasierten Tumoren zu erklären ist. Es lässt sich lediglich erkennen, dass der Proliferationsmarker Ki67 eine Altersabhängigkeit zeigt, die jedoch auch hier wieder von der Art des Tumors abhängig ist. So zeigte zum Beispiel beim kolorektalen Karzinom der Marker Ki67 eine positive Korrelation mit dem Alter. Interessant dabei war allerdings, dass dies nur für weniger differenzierte Tumore galt. Bei Frühstadien konnte ein Unterschied zwischen alten und jungen Patienten nicht mehr gezeigt werden (Tanaka et al. 2002). Übertragen auf unsere Ergebnisse könnte dies bedeuten, dass bei den älteren Patienten mit Metasta-

sen deshalb die höchste Ki67-Expression vorlag, weil diese Patienten die am wenigsten differenzierten Tumoren aufwiesen. Die Frage, die sich allerdings dann zwangsläufig stellt, ist, warum es in Bezug auf den Marker PCNA die jüngeren Patienten waren, welche die höchste Marker-Expression aufgewiesen hatten.

Anders als beim kolorektalen Karzinom zeigte sich bei anderen Tumorarten eine Abnahme der Ki67-Expression mit zunehmendem Alter. Dies konnte zum Beispiel für das Hypophysenadenom (Tanaka et al. 2003) oder in einer aktuellen Studie für das Mammakarzinom gezeigt werden (Burnazde et al. 2006). Ähnliche Ergebnisse in Bezug auf das Mammakarzinom fanden sich auch bereits in einer früheren Untersuchung (Eppenberger-Castori et al. 2002). In einer weiteren Mammakarzinom-Studie wurde festgestellt, dass ein Ki67-Anteil von mehr als 10 Prozent mit einem 4,4-fachen Risiko für Lymphknotenmetastasen verbunden ist; ein Zusammenhang mit dem Alter war hierbei allerdings nicht gegeben (Orulevic et al. 2002). Wiederum hat man aber auch in dieser Studie leider keine Analyse angestellt, die mit unserer Studie direkt vergleichbar wäre. Es wurde also keine Berechnung durchgeführt, die aufzeigt, wie hoch in den beiden untersuchten Altersgruppen die Ki67-Expression in Abhängigkeit von der Metastasierung war bzw. ob hier statische Unterschiede bestanden.

Eine mögliche Erklärung, warum es in unserer Studie zu den unterschiedlichen Ergebnissen für Ki67 und PCNA gekommen ist, liegt womöglich darin, dass nur Misch-tumoren untersucht wurden, eine Betrachtung nach unterschiedlicher histologischer Zusammensetzung der Tumoren aber unterblieben ist. Aus diesem Grund sollte eine Überprüfung der Ergebnisse anhand eines neuen Kollektivs mit reinen Tumoren erfolgen bzw. sollten die einzelnen histologischen Komponenten eines Mischtumors getrennt mit separat bestimmten Ki67- und PCNA-Raten betrachtet werden.

* * *

Zusammenfassend ergaben sich Hinweise, dass sich bei jüngeren Patienten (<25 Jahre) der Proliferationsmarker PCNA als Prädiktor für eine Metastasierung eignet, bei älteren Patienten (≥ 25 Jahre) könnte dies für den Marker Ki67 der Fall sein. In Studien und im Falle der praktischen Anwendung dieser beiden Proliferationsmarker sollte deshalb das

Alter berücksichtigt werden, wenn man aussagekräftige Ergebnisse erhalten möchte. Die Kombination des Faktors Alter mit anderen Risikofaktoren bzw. Prädiktoren könnte vermutlich die Sicherheit der Prognose über das bisher bekannte Maß hinaus steigern. Im Rahmen künftiger Studien sollte dies gezielt untersucht werden. Außerdem sollte geprüft werden, inwiefern sich auch im Hinblick auf andere Prädiktoren ein relevanter Zusammenhang mit dem Alter ergibt.

Was die Ursachen für die gemachten Beobachtungen sind, bleibt offen. Als gesichert kann betrachtet werden, dass es in Bezug auf die beiden Proliferationsmarker eine Altersabhängigkeit gibt. Diese scheint jedoch vom pathologischen Substrat bzw. vom Tumor abhängig zu sein.

Ähnliche Beobachtungen wurden auch für andere Tumormarker gemacht. So konnte zum Beispiel für MMP-2 (Matrix-Metalloproteinase-2) bei Brustkrebspatientinnen gezeigt werden, dass ein positiver Marker-Befund bei jüngeren Patienten (<40 J.) mit einem deutlich höheren Rezivrisiko verbunden ist als bei älteren (Talvensaari-Mattila et al. 1999). Auch bei gesundem Gewebe können bestimmte Tumormarker eine Altersabhängigkeit zeigen, wie für AMACR (Alpha-Methyl-CoA Racemase) beim Prostatagewebe demonstriert werden konnte. Jüngere Männer wiesen höhere Werte auf als ältere (Gologan et al. 2005). Ähnliches scheint auch für die CD34-Expression (Marker für die Angiogenese bei Tumoren) beim Ovarialkarzinom zu gelten. Auch hier zeigten sich bei der jüngsten Altersgruppe die höchsten Werte. Für andere Tumormarker, wie p53 (Tumorsupressor-Gen-Produkt) und HER2 (Tumorstwachstumsmarker) konnte eine Altersabhängigkeit bei diesem Tumortyp allerdings nicht gezeigt werden (Chan et al. 2004).

4.1.4 Zusammenhang zwischen Proliferationsmarkern und Tumorart

Im Gegensatz zu heute wurden zum Zeitpunkt unserer Studie innerhalb der NSGCT auch noch die adulten bzw. reifen Teratome differenziert.

In unserem Patientengut fanden sich sieben Patienten mit reinem adulten Teratom. Wir konnten zeigen, dass der durchschnittliche Anteil Ki67-positiver Zellen bei dieser Tumorart deutlich geringer ist als bei den übrigen nicht-seminomatösen Tumoren im klinischen Stadium I (30,0 vs. 49,6; $p=0,024$).

Für den Marker PCNA konnte dieser Zusammenhang allerdings nicht nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis ist insofern von Relevanz, als dass bei der Festlegung von Grenzwerten berücksichtigt werden sollte, ob es sich um reine reife Teratome oder anderweitige nicht-seminomatöse Hodentumore handelt. Bei Patienten mit reinen reifen Teratomen oder großem Teratomanteil im Tumor wären niedrigere Grenzwerte als Maß für eine putative okkulte Metastasierung anzusetzen als bei den übrigen Tumoren. Einschränkend ist jedoch zu erwähnen, dass es nach der aktuellen WHO-Klassifikation eine Einteilung in reife Teratome nicht mehr gibt.

Es kann aufgrund unserer Ergebnisse vermutet werden, dass adulte reife Teratome unabhängig von der Metastasierung eine geringere Proliferationsrate aufweisen. Der Beweis dieser These bleibt allerdings künftigen Studien vorbehalten, da bei uns keines der adulten reifen Teratome metastasierte.

Insgesamt gehört das adulte reife Teratom mit einer Häufigkeit von etwa fünf Prozent zu den eher seltenen NSGCT (Heidenreich et al. 1997a; Moul et al. 1994). Wesentlich häufiger werden Teratome als Komponenten eines Mischtumors gefunden (Sesterhenn et al. 1992; Moul et al. 1994). In einigen Studien ergaben sich Anhaltspunkte dafür, dass die Prognose eines NSGCT-Mischtumors umso besser ist, je größer der Anteil des adulten reifen Teratoms ist (Sturgeon et al. 1992; Stevens et al. 1994; Simmond et al. 1996). Im Hinblick auf die Häufigkeit der Metastasierung liegen in der Literatur wegen des eher seltenen Vorkommens allerdings nur wenige Angaben vor. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sollen bis zu 25 Prozent der reifen adulten Teratome beim Erwachsenen bzw. postpubertären Patienten eine retroperitoneale Metastasierung aufweisen (Herr und LaQuaglia 1993; Heidenreich 1997a). Heidenreich et al. (1997a) fanden in eigenen Untersuchungen eine Metastasierungsrate von 44 Prozent; die Rate bei Patienten mit klinischem Stadium I lag hierbei mit 24 Prozent allerdings

deutlich niedriger. Diese Zahl konnte in einer weiteren Studie bestätigt werden, in welcher eine Metastasierungsrate von 27 Prozent ermittelt worden war (Heidenreich et al. 1998).

Sofern die Daten von Heidenreich et al. als allgemeingültig zu Grunde gelegt werden, ist festzustellen, dass die Prognose bzw. die Metastasierungsrate bei reifen Teratomen kaum besser ist als bei den übrigen NSGCT, die bekanntermaßen bei Vorliegen des klinischen Stadium I eine Metastasierungsrate von etwa 30 Prozent aufweisen, die demnach nur unwesentlich größer ist als bei den reifen Teratomen. Eine Differenzierung erscheint im Hinblick auf die Prognose aus diesem Grund also tatsächlich nicht mehr erforderlich. Von Bedeutung zu sein scheint eine solche Differenzierung jedoch dann, wenn man die Tumor-Proliferationsmarker als prädiktive Parameter einsetzen will, denn gemäß unserer Daten scheinen Patienten mit reifem adulten Teratom geringere Marker-Anteile aufzuweisen als die übrigen NSGCT-Patienten. Daraus ließe sich schließen, dass auch Patienten mit größerem Teratom-Anteil im Misch tumor geringere Tumormarker-Anteile aufweisen.

Zusammenfassend ausgeführt erscheint es sinnvoll, bei der Interpretation von Studienergebnissen generell für die einzelnen histologischen Komponenten eines Misch tumors separate Proliferationsraten zu betrachten, um größere Schwankungen bei den Ergebnissen zu vermeiden. Nur bei möglichst homogenem Patientengut können im Übrigen die Ergebnisse unterschiedlicher Studien auch miteinander verglichen werden. Und auch nur dann, wenn alle möglichen Einflussgrößen berücksichtigt sind, können Grenzwerte festgelegt werden, die auch auf die praktische Anwendung übertragbar sind.

5 Zusammenfassung

Der Hodentumor ist die häufigste Krebsart bei Männern zwischen 20 und 35 Jahren, wobei die Inzidenz ständig ansteigt. Gleichzeitig hat sich der Hodenkrebs zum Musterbeispiel der heilbaren Tumorerkrankung entwickelt. Die meisten dieser Tumoren werden heute im Frühstadium diagnostiziert.

Etwa 30 Prozent der nicht-seminomatösen Hodentumoren (NSGCT) im Stadium I weisen bei der Diagnosestellung Metastasen auf. Das Hauptproblem dabei ist die schlechte Aussagekraft der klinischen Diagnoseverfahren im Hinblick auf diese okkulten Metastasen. Zwar können heute in Abhängigkeit von einer vaskulären Invasion des Tumors eine Hochrisiko- und eine Niedrigrisikogruppe differenziert und risikoadaptiert therapiert werden, jedoch werden in der Hochrisikogruppe noch immer etwa die Hälfte der Patienten unnötig therapiert, da keine okkulten Metastasen vorhanden sind. In der Niedrigrisikogruppe hingegen bleiben bei etwa 15 Prozent der Patienten diese Metastasen unbehandelt.

Um die Sicherheit der Prognose bei der Einteilung von Patienten in eine Hoch- und Niedrigrisikogruppe zu erhöhen, muss nach prädiktiven Faktoren für die okkulte Metastasierung bzw. für deren Ausschluss gesucht werden. Ziel unserer Studie war es deshalb, die Tumor-Proliferationsmarker PCNA und Ki67 im Hinblick auf ihre Tauglichkeit und klinische Bedeutsamkeit als solche Prädiktoren zu untersuchen.

In unserer Studie wurden Orchiektomiepräparate von insgesamt 37 Patienten mit nicht-seminomatösen Hodentumoren im klinischen Stadium I untersucht. Dabei wurden 18 metastasierte mit 17 nicht-metastasierten Tumoren verglichen.

Es konnte erstmalig demonstriert werden, dass das Alter einen Einfluss auf die Ergebnisse hat und deshalb bei der Interpretation der Befunde berücksichtigt werden sollte. Dabei stellte sich heraus, dass sich der Marker PCNA nur bei jüngeren Patienten (<25 Jahre) als signifikanter Prädiktor eignet. Umgekehrt war der Marker Ki67 nur bei älteren Patienten (>25 Jahre) von signifikantem Nutzen. Unter Berücksichtigung eines

Schwellenwertes von 60 Prozent (Anteil [+]markierter Zellen) konnte mittels des Markers PCNA bei 85,7 Prozent der jüngeren Patienten die richtige Diagnose (metastasiert[+] oder metastasiert[-]) gestellt werden. Der positiv prädiktive Wert lag bei 90 Prozent. Für den Marker Ki67 konnte unter Berücksichtigung eines Schwellenwertes von 60 Prozent bei 82,6 Prozent der älteren Patienten die richtige Diagnose gestellt werden. Sowohl der positive als auch der negative prädiktive Wert lagen bei ca. 83 Prozent. Eine Differenzierung zwischen Patienten mit adulten Teratomen bzw. hohem Teratomanteil im Tumor schien von ähnlicher Relevanz zu sein. Allerdings wies keiner der Teratom-Patienten in unserer Studie Metastasen auf, so dass eine abschließende Beurteilung diesbezüglich nicht möglich war. Die im Hinblick auf das Alter unterschiedlichen Ergebnisse zwischen Ki67 und PCNA könnten darauf zurückzuführen sein, dass die Mischtumoren nicht getrennt nach ihrer histologischen Zusammensetzung untersucht wurden.

Wie demonstriert werden konnte, scheinen die beiden Proliferationsmarker PCNA und Ki67 das Potential zu haben, sich als Prädiktoren zu eignen, um das Risiko okkulten Metastasen bei Patienten mit NSGCT im Stadium I besser abzuschätzen. Unter Berücksichtigung von Altersgruppen und Tumortyp könnte es möglich werden, Schwellenwerte zu definieren, die für den praktischen Einsatz eine ausreichende Verbindlichkeit besitzen. Durch Kombination der untersuchten Prädiktoren mit anderen prognostischen Faktoren, wie zum Beispiel der vaskulären Invasion oder dem embryonalen Tumorananteil, dürfte in Zukunft eine wesentlich bessere Differenzierung zwischen Hoch- und Niedrigrisikogruppe gelingen. Ziel weiterer Untersuchungen muss es sein, unsere Ergebnisse zu bestätigen und verbindliche Schwellenwerte festzulegen.

6 Summary

Testicular cancer (germ cell tumour) is the most frequent malignant tumour type in young men with continuously increasing incidence. However, testicular has become a model for a curable neoplasm. Most of these tumours were diagnosed at early stage.

The clinical stage of nonseminomatous germ cell tumour (NSGCT) is inaccurate in 30 percent of patients and occult metastasis must be expected. This means that these patients are incorrectly clinical staged. Histopathologic risk factors like vascular invasion may differ between low and high risk group, nevertheless more than half of the high risk patients is free of occult metastasis and 15 percent of low risk patients is untreated despite occult metastasis.

To avoid unnecessary treatment, predictive parameters for occult metastasis must be identified. Aim of this study was, to evaluate the tumour proliferation markers PCNA and Ki67 and demonstrate the clinical significance.

Orchiectomy specimens of 37 patients with clinical stage I NSGCT were retrospectively analyzed by PCNA and Ki67 immunostaining. 18 Patients had pathologic stage I and 17 patients had pathologic stage II (occult metastasis) as shown by retroperitoneal lymph node dissection.

Patient age was found to be a strong confounder and therefore should be considered with regard to the results. As shown, only in younger patients (<25), but not in older (≥ 25) PCNA was a significant predictor for occult metastasis. Otherwise Ki67 was a significant predictor only in older patients (≥ 25), but not in young (<25). Using a 60% PCNA cutoff value pathologic stages were correctly classified in 87,5 percent of the young patients. Positive predictive value was 90 percent. Using a 60% Ki67 cutoff value, pathologic stages were correctly classified in 83 percent of the older patients with positive predictive value of 83 percent.

As shown, both markers, PCNA and Ki67, might be useful as predictive values for occult metastasis in clinical stage I NNGCT. If age as confounding factor will be taken into consideration, defining of reliable cutoff values for clinical use may be possible in future. Combination with traditional risk factors and predictors such as percentage of embryonal carcinoma or vascular invasion might enhance the ability of distinguish between high and low risk groups. The results of this study should be confirmed by further investigations and reliable cutoff values should be defined for clinical use.

7 Literaturverzeichnis

- Albers P, Miller GA, Orazi A, Ulbright TM, Albers J, Donohue JP, Foster RS. Immunohistochemical assessment of tumor proliferation and volume of embryonal carcinoma identify patients with clinical stage A nonseminomatous testicular germ cell tumor at low risk for occult metastasis. *Cancer*. 1995a; 75(3): 844-850.
- Albers P, Orazi A, Ulbright TM, Miller GA, Haidar JH, Donohue JP, Foster RS. Prognostic significance of immunohistochemical proliferation markers (Ki-67/MIB-1 and proliferation-associated nuclear antigen), p53 protein accumulation, and neovascularization in clinical stage A nonseminomatous testicular germ cell tumors. *Mod Pathol*. 1995b; 8(5): 492-497.
- Albers P, Ulbright TM, Albers J, Miller GA, Foster RS, Donohue JP. Neue Parameter zur Vorhersage des pathologischen Stadiums bei nichtseminomatösen Hodentumoren im klinischen Stadium I. *Urologe A*. 1995c; 34(4): 316-323.
- Albers P, Bierhoff E, Neu D, Fimmers R, Wernert N, Muller SC. MIB-1 immunohistochemistry in clinical stage I nonseminomatous testicular germ cell tumors predicts patients at low risk for metastasis. *Cancer*. 1997; 79(9): 1710-1716.
- Albers P, Siener R, Kliesch S, Weissbach L, Krege S, Sparwasser C, Schulze H, Heidenreich A, de Riese W, Loy V, Bierhoff E, Wittekind C, Fimmers R, Hartmann M; German Testicular Cancer Study Group. Risk factors for relapse in clinical stage I nonseminomatous testicular germ cell tumors: results of the German Testicular Cancer Study Group Trial. *J Clin Oncol*. 2003; 21(8): 1505-1512.
- Alexandre J, Fizazi K, Mahe C, Culine S, Droz JP, Theodore C, Terrier-Lacombe MJ. Stage I non-seminomatous germ-cell tumours of the testis: identification of a subgroup of patients with a very low risk of relapse. *Eur J Cancer*. 2001; 37(5): 576-582.

Bergstrom R, Adami HO, Mohner M, Zatonski W, Storm H, Ekbom A, Tretli S, Teppo L, Akre O, Hakulinen T. Increase in testicular cancer incidence in six European countries: a birth cohort phenomenon. *J Natl Cancer Inst.* 1996; 88(11): 727-733.

Bohlen D, Burkhard FC, Mills R, Sonntag RW, Studer UE. Fertility and sexual function following orchiectomy and 2 cycles of chemotherapy for stage I high risk non-seminomatous germ cell cancer. *J Urol.* 2001; 165(2): 441-444.

Bokemeyer C, Schmoll HJ. Secondary neoplasms following treatment of malignant germ cell tumors. *J Clin Oncol.* 1993; 11(9): 1703-1709.

Bokemeyer C, Hossfeld D. Tumore der männlichen Genitalorgane. Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO) (Hrsg.) Stand: 20. August 2004: 1-12. http://www.dgho.de/_cmsdata/_file/file_108.pdf

Burnadze KG, Tavzarashvili ID, Gabuniia UA, Mchedlishvili MIu. [Breast cancer immunohistochemical features in different age groups] [Article in Russian] *Georgian Med News.* 2006; (132): 27-29.

Celenligil-Nazliel H, Ayhan A, Uzun H, Ruacan S. The effect of age on proliferating cell nuclear antigen expression in oral gingival epithelium of healthy and inflamed human gingiva. *J. Periodontol.* 2000; 71(10): 1567-1574.

Chan JK, Loizzi V, Magistris A, Lin F, Rutgers J, Osann K, Disaia PJ, Berman ML. Differences in prognostic molecular markers between women over and under 45 years of age with advanced ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10(24): 8538-8543.

Dabrowski A, Szumilo J, Brajerski G, Wallner G. Proliferating nuclear antigen (PCNA) as a prognostic factor of squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska [Med]*. 2001; 56: 59-67.

DeSantis M, Albrecht W, Holtl W, Pont J. Impact of cytotoxic treatment on long-term fertility in patients with germ-cell cancer. *Int J Cancer*. 1999; 83(6): 864-5.

Dieckmann KP, Pichlmeier U. The prevalence of familial testicular cancer: an analysis of two patient populations and a review of the literature. *Cancer*. 1997; 80(10): 1954-1960.

Dieckmann KP, Pichlmeier U. Clinical epidemiology of testicular germ cell tumors. *World J Urol*. 2004 Apr;22(1):2-14. Epub 2004 Mar 18.

Dobros W, Rys J, Niezabitowski A, Olszewski E. The prognostic value of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the advanced cancer of larynx. *Auris Nasus Larynx*. 1998; 25(3): 295-301.

Donhuijsen K. Histologisches Malignitätsgrading. Prinzipien, Möglichkeiten und klinische Relevanz. *Dt Aerztebl*. 1998; 95(39): A-2391-2395.

Einhorn LH. Treatment of testicular cancer: a new and improved model. *J Clin Oncol*. 1990; 8(11): 1777-1781.

Eppenberger-Castori S, Moore DH, Thor AD, Edgerton SM, Kueng W, Eppenberger U, Benz CC. Age-associated biomarker profiles of human breast cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2002; 34(11): 1318-1330.

Gologan A, Bastacky S, McHale T, Yu J, Cai C, Monzon-Bordonaba F, Dhir R. Age-associated changes in alpha-methyl CoA racemase (AMACR) expression in nonneoplastic prostatic tissues. *Am. J. Surg. Pathol*. 2005; 29(11): 1435-1441.

- Gospodarowicz MK, Miller D, Groome PA, Greene FL, Logan PA, Sobin LH. The process for continuous improvement of the TNM classification. *Cancer*. 2004 Jan 1; 100(1):1-5.
- Harland SJ, Cook PA, Fossa SD, Horwich A, Mead GM, Parkinson MC, Roberts JT, Stenning SP. Intratubular germ cell neoplasia of the contralateral testis in testicular cancer: defining a high risk group. *J Urol*. 1998; 160(4): 1353-1357.
- Hartmann JT, Albrecht C, Schmoll HJ, Kuczyk MA, Kollmannsberger C, Bokemeyer C. Long-term effects on sexual function and fertility after treatment of testicular cancer. *Br J Cancer*. 1999; 80(5-6): 801-807.
- Heidenreich A, Schenkman NS, Sesterhenn IA, Mostofi FK, McCarthy WF, Heidenreich B, Moul JW. Immunohistochemical expression of Ki-67 to predict lymph node involvement in clinical stage I nonseminomatous germ cell tumors. *J Urol*. 1997; 158(2): 620-625.
- Heidenreich A, Neubauer S, Mostofi FK, Sesterhenn IA, Moul JW, Engelmann UH. Das reife Teratom des Hodens im klinischen Stadium I--retroperitoneale Lymphadenektomie oder Surveillance? *Urologe A*. 1997a; 36(5): 440-444.
- Heidenreich A, Sesterhenn IA, Mostofi FK, Moul JW. Prognostic risk factors that identify patients with clinical stage I nonseminomatous germ cell tumors at low risk and high risk for metastasis. *Cancer*. 1998; 83(5): 1002-1011.
- Heidenreich A, Sesterhenn IA, Mostofi FK, Moul JW, Engelmann UH. Histopathologische und biologische Prognosefaktoren nichtseminomatöser Keimzelltumoren im klinischen Stadium I. *Urologe A*. 1999; 38(2): 168-178.
- Herr HW, LaQuaglia MP. Management of teratoma. *Urol. Clin. North Am*. 1993; 20(1): 145-152.

Hori K, Uematsu K, Yasoshima H, Sakurai K, Yamada A. Contribution of cell proliferative activity to malignancy potential in testicular seminoma. *Pathol Int.* 1997; 47(5): 282-287.

IARC (International Agency for Research on Cancer). GLOBOCAN 2002 Database.
<http://www-dep.iarc.fr>

IARC (International Agency for Research on Cancer). CI5 I-VIII updated Database.
<http://www-dep.iarc.fr>

Isozaki H, Okajima K, Ichinona T, Fujii K, Nomura E, Izumi N, Takeda Y. Significance of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in gastric cancer in relation to lymph node metastasis. *J Surg Oncol.* 1996; 61(2): 106-110.

Klein EA. Tumor markers in testis cancer. *Urol Clin North Am.* 1993; 20(1): 67-73.

Klepp O, Dahl O, Flodgren P, Stierner U, Olsson AM, Oldbring J, Nilsson S, Daehlin L, Tornblom M, Smaland R, Starkhammar H, Abramsson L, Wist E, Raabe N, Edekling T, Cavallin-Stahl E. Risk-adapted treatment of clinical stage 1 non-seminoma testis cancer. *Eur J Cancer.* 1997; 33(7): 1038-1044.

Kliesch S, Behre HM, Jurgens H, Nieschlag E. Cryopreservation of semen from adolescent patients with malignancies. *Med Pediatr Oncol.* 1996; 26(1): 20-27.

Krege S, Albers P, Schmidberger H. Behandlung von nicht und mäßig metastasierten Hodentumoren Treatment of non-metastatic and moderate metastatic testicular cancer. *Deutsch Ärztebl.* 2005; 102(46): A-3191-3194.

Laguna MP, Pizzocaro G, Klepp O, Algaba F, Kisbenedek L, Leiva O; EAU Working Group on Oncological Urology. EAU guidelines on testicular cancer. *Eur Urol.* 2001; 40(2): 102-110.

Leibovitch I, Foster RS, Kopecky KK, Albers P, Ulbright TM, Donohue JP. Identification of clinical stage A nonseminomatous testis cancer patients at extremely low risk for metastatic disease: a combined approach using quantitative immunohistochemical, histopathologic, and radiologic assessment. *J Clin Oncol.* 1998; 16(1): 261-268.

Lellé RJ, Heidenreich W, Stauch G, Gerdes J. The correlation of growth fractions with histologic grading and lymph node status in human mammary carcinoma. *Cancer* 1987; 59: 83-88.

Maehara Y, Emi Y, Tomisaki S, Oshiro T, Kakeji Y, Ichiyoshi Y, Sugimachi K. Age-related characteristics of gastric carcinoma in young and elderly patients. *Cancer.* 1996; 77(9): 1774-1780.

Matsumoto K, Moriuchi T, Koji T, Nakane PK. Molecular cloning of cDNA coding for rat proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin. *EMBO J.* 1987; 6(3) :637-642.

Moul JW, McCarthy WF, Fernandez EB, Sesterhenn IA. Percentage of embryonal carcinoma and of vascular invasion predicts pathological stage in clinical stage I nonseminomatous testicular cancer. *Cancer Res.* 1994; 54(2): 362-364.

Munakata S, Hendricks JB. Effect of fixation time and microwave oven heating time on retrieval of the Ki-67 antigen from paraffin-embedded tissue. *J. Histochem. Cytochem.* 1993; 41(8): 1241-1246.

Myoung H, Kim MJ, Lee JH, Ok YJ, Paeng JY, Yun PY. Correlation of proliferative markers (Ki-67 and PCNA) with survival and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: a clinical and histopathological analysis of 113 patients. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2006; 35(11): 1005-1010.

Nichols CR. Testicular cancer. *Curr Probl Cancer.* 1998; 22(4): 187-274.

Orucevic A, Reddy VB, Bloom KJ, Bitterman P, Magi-Galluzzi C, Oleske DM, Phillips M, Gould VE, Cobleigh M, Wick MR, Gattuso P. Predictors of lymph node metastasis in T1 breast carcinoma, stratified by patient age. *Breast J.* 2002; 8(6): 349-355.

Petersen PM, Skakkebaek NE, Vistisen K, Rorth M, Giwercman A. Semen quality and reproductive hormones before orchiectomy in men with testicular cancer. *J Clin Oncol.* 1999; 17(3): 941-917.

Pont J, Albrecht W, Postner G, Sellner F, Angel K, Holth W. Adjuvant chemotherapy for high-risk clinical stage I nonseminomatous testicular germ cell cancer: long-term results of a prospective trial. *J Clin Oncol.* 1996; 14(2): 441-448.

Pottek TS, Hartmann M, Bokemeyer C. Nachsorge und Spättoxizitäten bei Hodentumoren. *Deutsch Ärztebl.* 2005; 102 (48): A-3342-3348.

Read G, Stenning SP, Cullen MH, Parkinson MC, Horwich A, Kaye SB, Cook PA. Medical Research Council prospective study of surveillance for stage I testicular teratoma. Medical Research Council Testicular Tumors Working Party. *J Clin Oncol.* 1992; 10(11): 1762-1768.

Robertson GS. Radical orchidectomy and benign testicular conditions. *Br J Surg.* 1995 Mar;82(3):342-5.

Royal College of Radiologist' Clinical Oncology Network. Guidelines on the management of adult testicular cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2000; 12(5): 173-210.

Sarac S, Ayhan A, Hosal AS, Kaya S. Prognostic significance of PCNA expression in laryngeal cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998; 124(12): 1321-1324.

Schmoll HJ, Souchon R, Krege S, Albers P, Beyer J, Kollmannsberger C, Fossa SD, Skakkebaek NE, de Wit R, Fizazi K, Droz JP, Pizzocaro G, Daugaard G, de Mulder PH, Horwich A, Oliver T, Huddart R, Rosti G, Paz Ares L, Pont O, Hartmann JT, Aass N, Algaba F, Bamberg M, Bodrogi I, Bokemeyer C, Classen J, Clemm S, Culine S, de Wit M, Derigs HG, Dieckmann KP, Flasshove M, Garcia del Muro X, Gerl A, Germa-Lluch JR, Hartmann M, Heidenreich A, Hoeltl W, Joffe J, Jones W, Kaiser G, Klepp O, Kliesch S, Kisbenedek L, Koehrmann KU, Kuczyk M, Laguna MP, Leiva O, Loy V, Mason MD, Mead GM, Mueller RP, Nicolai N, Oosterhof GO, Pottek T, Rick O, Schmidberger H, Sedlmayer F, Siegert W, Studer U, Tjulandin S, von der Maase H, Walz P, Weinknecht S, Weissbach L, Winter E, Wittekind C. European consensus on diagnosis and treatment of germ cell cancer: a report of the European Germ Cell Cancer Consensus Group (EGCCCG). *Ann Oncol.* 2004; 15(9): 1377-1399.

Schrader M, Weißbach L, Miller K. Therapie von Hodentumoren. *Deutsch Arztebl.* 2004; 101(39): A2612-2618.

Sesterhenn IA, Weiss RB, Mostofi FK, Stablein DM, Rowland RG, Falkson G, Rivkind SE, Vogelzang NJ. Prognosis and other clinical correlates of pathologic review in stage I and II testicular carcinoma: a report from the Testicular Cancer Inter-group Study. *J. Clin. Oncol.* 1992; 10(1): 69-78.

Simmonds PD, Lee AH, Theaker JM, Tung K, Smart CJ, Mead GM. Primary pure teratoma of the testis. *J. Urol.* 1996; 155(3): 939-942.

Sobin LH. TNM: principles, history, and relation to other prognostic factors. *Cancer.* 2001; 91(8 Suppl): 1589-1592.

Souchon R, Krege S, Schmoll HJ, Albers P, Beyer J, Bokemeyer C, Classen J, Dieckmann KP, Hartmann M, Heidenreich A, Hörtl W, Kliesch S, Köhrmann KU, Kuczyk M, Schmidberger H, Weinknecht S, Winter E, Wittekind C, Bamberg M. Interdisziplinärer Konsensus zur Diagnostik und Therapie von Hodentumoren. Strahlenther Onkol 2000; 176 (9): 388-405.

Souchon R, Schmoll HJ, Krege S. Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Hodentumoren auf Grundlage evidenzbasierter Medizin (EBM). Deutsche Krebsgesellschaft e.V. (Hrsg.) 1. Aufl. Zuckerschwerdt Verlag München 2002; 1-47.

Sparwasser C, Treiber U, Beckert R, Pust RA. Die modifizierte retroperitoneale Lymphadenektomie beim nichtseminomatösen Hodentumor im Stadium I, IIa und IIb. Urologe. 1995; 34: 444-448.

Spermon JR, Roeleveld TA, van der Poel HG, Hulsbergen-van de Kaa CA, Ten Bokkel Huinink WW, van de Vijver M, Witjes JA, Horenblas S. Comparison of surveillance and retroperitoneal lymph node dissection in Stage I nonseminomatous germ cell tumors. Urology. 2002; 59(6): 923-929.

Spermon JR, Hoffmann AL, Horenblas S, Verbeek AL, Witjes JA, Kiemeny LA. The efficacy of different follow-up strategies in clinical stage I Non-seminomatous Germ Cell Cancer: a Markov simulation study. Eur Urol. 2005; 48(2): 258-267.

Stevens MJ, Norman AR, Fisher C, Hendry WF, Dearnaley DP, Horwich A. Prognosis of testicular teratoma differentiated. Br J Urol. 1994; 73(6): 701-706.

Strumberg D, Brugge S, Korn MW, Koeppen S, Ranft J, Scheiber G, Reiners C, Mockel C, Seeber S, Scheulen ME. Evaluation of long-term toxicity in patients after cisplatin-based chemotherapy for non-seminomatous testicular cancer. Ann Oncol. 2002; 13(2): 229-236.

Sturgeon JF, Jewett MA, Alison RE, Gospodarowicz MK, Blend R, Herman S, Richmond H, Thomas G, Duncan W, Munro A. Surveillance after orchidectomy for patients with clinical stage I nonseminomatous testis tumors. *J. Clin. Oncol.* 1992; 10(4): 564-568.

Sweeney CJ, Hermans BP, Heilman DK, Foster RS, Donohue JP, Einhorn LH. Results and outcome of retroperitoneal lymph node dissection for clinical stage I embryonal carcinoma--predominant testis cancer. *J Clin Oncol.* 2000; 18(2): 358-362.

Talvensaari-Mattila A, Turpeenniemi-Hujanen T. MMP-2 positivity and age less than 40 years increases the risk for recurrence in premenopausal patients with node-positive breast carcinoma. *Breast Cancer Res. Treat.* 1999; 58(3): 287-293.

Tanaka Y, Hongo K, Tada T, Sakai K, Kakizawa Y, Kobayashi S. Growth pattern and rate in residual nonfunctioning pituitary adenomas: correlations among tumor volume doubling time, patient age, and MIB-1 index. *J. Neurosurg.* 2003; 98(2): 359-365.

Tanaka K, Nagaoka S, Takemura T, Arai T, Sawabe M, Takubo K, Sugihara K, Kitagawa M, Hirokawa K. Incidence of apoptosis increases with age in colorectal cancer. *Exp. Gerontol.* 2002;37(12): 1469-1479.

Travis LB, Curtis RE, Storm H, Hall P, Holowaty E, Van Leeuwen FE, Kohler BA, Pukkala E, Lynch CF, Andersson M, Bergfeldt K, Clarke EA, Wiklund T, Stoter G, Gospodarowicz M, Sturgeon J, Fraumeni JF Jr, Boice JD Jr. Risk of second malignant neoplasms among long-term survivors of testicular cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1997; 89(19): 1429-1439.

Travis LB, Andersson M, Gospodarowicz M, van Leeuwen FE, Bergfeldt K, Lynch CF, Curtis RE, Kohler BA, Wiklund T, Storm H, Holowaty E, Hall P, Pukkala E, Sleijfer DT, Clarke EA, Boice JD Jr, Stovall M, Gilbert E. Treatment-associated leukemia following testicular cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92(14): 1165-1171.

Tu P, Miyauchi S, Miki Y. Age-related proliferative activity in dermal melanocytic naevi detected by PCNA/cyclin expression. *Br. J. Dermatol.* 1993; 129(1): 65-68.

UICC (Union Against Cancer Committee). TNM Klassifikation maligner Tumoren. Wittekind C, Meyer HJ, Bootz F. (Hrsg). 6. Aufl. Springer, Berlin Heidelberg New York 2002.

Vergouwe Y, Steyerberg EW, Eijkemans MJ, Albers P, Habbema JD. Predictors of occult metastasis in clinical stage I nonseminoma: a systematic review. *J Clin Oncol.* 2003; 21(22): 4092-4099.

Weißbach L, Haarstrick A, Bussar-Maatz R. Hodentumoren. In: Seebers S, Schütte J. (Hrsg.). *Therapiekonzepte Onkologie.* Springer, Berlin Heidelberg 1995; 844-870.

Wilkinson EJ, Hendricks JB. Role of the pathologist in biomarker studies. *J Cell Biochem Suppl.* 1995; 23: 8-10.

Winter E, Kliesch S, Souchon R, de Wit M. Diagnostik des Hodentumors. *Dtsch Arztebl.* 2005; 102(44): A3021-3025.

Wu X, Zhang Z, Cai S. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in ovarian carcinoma and its relation to lymph node metastasis and prognosis. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 1998; 20(1): 68-70.

Yue SQ, Yang YL, Dou KF, Li KZ. Expression of PCNA and CD44mRNA in colorectal cancer with venous invasion and its relationship to liver metastasis. World J Gastroenterol. 2003; 9(12): 2863-2865.

8 Anhang

Anlage 1: TNM-Klassifikation nach UICC (2002) unter Berücksichtigung der Tumor-marker

Anlage 1: TNM-Klassifikation nach UICC (2002) unter Berücksichtigung der Tumormarker.

T Primärtumor (angegeben meist als pT für pathologisch beurteilt)			
pTX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden (wenn keine radikale Orchiektomie durchgeführt wurde, wird der Fall als TX klassifiziert)		
pT0	Kein Anhalt für Primärtumor (z.B. histologische Narbe im Hoden)		
pTis	Intratubulärer Keimzelltumor (Carcinoma in situ)		
pT1	Tumor begrenzt auf Hoden und Nebenhoden, ohne Blut-/Lymphgefäßinvasion (der Tumor kann die Tunica albuginea infiltrieren, nicht aber die Tunica vaginalis)		
pT2	Tumor begrenzt auf Hoden und Nebenhoden, mit Blut-/Lymphgefäßinvasion, oder Tumor mit Ausdehnung durch die Tunica albuginea mit Befall der Tunica vaginalis		
pT3	Tumor infiltriert Samenstrang (mit der ohne Blut-/Lymphgefäßinvasion)		
pT4	Tumor infiltriert Scrotum (mit der ohne Blut-/Lymphgefäßinvasion)		
N Regionäre Lymphknoten (angegeben auch als pN für pathologisch beurteilt)			
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden		
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen		
N1	Metastasierung in Form eines Lymphknotenkonglomerats, 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung, und 5 oder weniger positive Lymphknoten, keine mehr als 2 cm in größter Ausdehnung		
N2	Metastasierung in Form eines Lymphknotenkonglomerats, mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 5 cm in größter Ausdehnung, oder mehr als 5 positive Lymphknoten, keiner mehr als 5 cm in größter Ausdehnung, oder extragonadale Tumorausbreitung		
N3	Metastasierung in Form eines Lymphknotenkonglomerats, mehr als 5 cm in größter Ausdehnung		
M Fernmetastasen			
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden		
M0	Keine Fernmetastasen		
M1	Fernmetastasen M1a Nicht-regionäre Lymphknoten- oder Lungenmetastasen M1b Andere Fernmetastasen		
S Serum-Tumormarker			
SX	Serum-Tumormarker nicht verfügbar		
SO	Serum-Tumormarker innerhalb der normalen Grenzen		
S1-S3	Mindestens einer der Serum-Tumormarker erhöht		
	LDH	HCG (IU/l)	AFP (µg/l)
S1	< 1,5 x Norm und	< 5000 und	< 1000
S2	1,5 - 10 x Norm oder	5.000 - 50.000 oder	1.000 - 10.000
S3	> 10 x Norm oder	> 50.000 oder	> 10.000

UICC = Union Against Cancer Committee

9 Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Markus Kneißl

10 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. med. Hans U. Schmelz für die Aufgabenstellung und die jahrelange Betreuung, auch über viele Bundeslandgrenzen hinweg.

Meinen Freunden Silvia Rathmann, Silke Rosinger und Peter Obst möchte ich für hilfreiche Ratschläge, immerwährendes Motivieren und die Einbringung von Computerkenntnissen danken.

Ein ganz besonderer Dank geht an die Abteilung Pathologie des Bundeswehrkrankenhauses Ulm für die konstruktive, unterstützende und stets freundliche Zusammenarbeit bei der Herstellung und Färbung der notwendigen Schnittpräparate. In diesem Zusammenhang besonders erwähnt seien Frau Ursula Möhnle und Frau Susanne Schur, die immer ein offenes Ohr und die notwendige Zeit für meine Anliegen hatten.